
Kraftspektroskopie an molekularen und supramolekularen biologischen Strukturen

Robert Andreas Lugmaier

Dissertation
an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Robert Andreas Lugmaier
aus Gräfelfing

München, den 24.04.2008

Erstgutachter: Prof. Dr. Hermann E. Gaub
Zweitgutachter: Prof. Dr. Joachim Rädler
Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2008

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Zusammenfassung	vii
1 Einleitung	1
2 Instrumente für Einzelmolekül- und Ensemble-Kraftmessungen	3
2.1 Aufbau und Funktion des AFM-Lichtmikroskop-Hybrids	3
2.1.1 Das Kraftspektroskop	3
2.1.2 Das Invers-Lichtmikroskop	5
2.1.2.1 Epi-Fluoreszenzmikroskopie	5
2.1.2.2 LED-Ring Phasenkontrastmikroskopie	6
2.1.2.3 Quasi-Trans DIC Mikroskopie	8
2.1.3 Piezo-Kalibrierung	9
2.1.4 Eichung der Federkonstante des Cantilevers	10
2.1.5 Kraft-Abstandskurven	12
2.2 Das Plastic-AFM	13
2.3 Die molekulare Kraftwaage	16
2.3.1 Aufbau und Funktion der molekularen Kraftwaage	16
2.3.2 Auswertung und Korrektur der Fluoreszenzaufnahmen	17
2.3.3 Dynamische Messung mit der molekularen Kraftwaage	19
3 Oberflächenfunktionalisierung und DNA-Anbindung	21
4 Die molekulare Bindung	24
5 Einzelmolekülexperimente an DNA-Oligomeren	28
5.1 Bindungskräfte kurzer DNA	28
5.2 BS-Übergänge bei kurzen DNA-Oligomeren	31
6 Ensembleexperimente an DNA-Oligomeren	34
6.1 Der kinetische Effekt	34
6.2 Vergleich MFB – AFM und energetische Betrachtung	36

7	Messungen an λ-Phagen-DNA	39
7.1	Länge des BS-Plateaus beim Rückfahren	39
7.2	Kraftrelaxation im Schmelzübergang	42
8	Messungen an P-Pili von <i>Escherichia coli</i>	46
8.1	Entstapelung und Rückstapelung der Pilus-Quartärstruktur	47
8.2	Spezifische Bindungskräfte der PapG-Adhäsine	49
9	Ausblick	51
A	Struktur der DNA	53
B	Protokolle zur Oberflächenfunktionalisierung und Anbindungschemie	55
B.1	Epoxy-Silanisierung	55
B.2	Aufschmelzen von Di-Amino-PEG und Umfunktionalisierung zu <i>COOH</i> . .	56
B.3	Anbindung von kurzen DNA-Oligomeren	58
B.4	Sequenzen von DNA-Oligomeren	60
B.5	Immobilisierung von λ -DNA	61
B.6	Puffer	61
B.7	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	61
B.8	Vorbereitung und Durchführung von Messungen an <i>Escherichia coli</i>	62
C	Polymermodelle	63
C.1	Das Freely-Jointed Chain (FJC) Modell	63
C.2	Das Worm-Like Chain (WLC) Modell	64
C.3	Entropische und enthalpische Elastizität	64
D	Software	65
	Literaturverzeichnis	66
	Publikationen	74
	Danksagung	116
	Curriculum Vitae	117
	Erklärung	118

Abbildungsverzeichnis

2.1	AFM-Hybrid-Aufbau	4
2.2	Fluoreszenzmikroskopie	6
2.3	Phasenkontrastmikroskopie	7
2.4	Quasi-Trans DIC Mikroskopie	8
2.5	Interferenz-Piezoeichung	9
2.6	Cantilever	10
2.7	Powerspektrum	11
2.8	Eindrückkurve	12
2.9	Korrektur der Cantileverbiegung	13
2.10	λ -Phagen DNA Kraft-Abstandskurven im Plastic-AFM	15
2.11	Entfaltung von GFP-Titin	15
2.12	Funktionsweise MFB	16
2.13	Ablauf MFB Messung	17
2.14	Fluoreszenzauswertung MFB	18
2.15	Dynamische Messungen mittels MFB	20
3.1	Test der Oberflächenfunktionalisierung mittels fluoreszenzmarkierter DNA	23
3.2	Anbindungstest DNA-Oligomere	23
4.1	Bindungspotential	26
5.1	Histogramme einer AFM Messung	29
5.2	Kraft vs. Ladungsrate	30
5.3	Kraft-Abstandskurven von 30bp DNA	33
6.1	Fluoreszenzaufnahme eines MFB Experiments mit Auftreten des kinetischen Effektes	35
6.2	Überlebenswahrscheinlichkeit des Probeduplexes und Ladungsratenprofil	36
6.3	Energielandschaft mit innerer und äußerer Barriere	37
7.1	Kraft-Abstandskurve einer λ -DNA	40
7.2	Kraft-Abstandskurve einer λ -DNA mit Schmelzübergang	41
7.3	Länge BS-Plateau bei Relaxation	42
7.4	Streckung und Relaxation von λ -DNA aufgetragen gegen die Zeit	43

7.5	Kraftrelaxation während Haltedauer	44
7.6	Kraftplateaus im Schmelzübergang	45
8.1	Kraft-Abstandskurve eines P-Pili von <i>E. coli</i>	47
8.2	Amino-Galabiose und lösliche Galabiose	49
8.3	Spezifische Bindung PapG-Galabiose	50
A.1	Struktur der DNA	54

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das mechanische Verhalten von Biomolekülen als Reaktion auf von außen angelegte Kräfte untersucht. Es wurde das Dehnungsverhalten sowie die Bindungspotentiale von kurzen 30 Basenpaar langen DNA-Oligomeren, von mehreren tausend Basenpaar langer λ -Phagen-DNA sowie von mehreren tausend Ig-Einheiten umfassenden P-Pili von *Escherichia coli* untersucht. Es wird also ein weiter Bogen von relativ kleinen Biomolekülen bis hin zu komplexen supramolekularen Strukturen gespannt.

Vorraussetzung für den Erkenntnisgewinn in der Biophysik ist die Entwicklung und Anwendung hochauflösender Messmethoden. So ist es gelungen, sowohl im Ensembleexperiment als auch im Einzelmolekülexperiment kleinste Unterschiede in Bindungsstärke und -charakteristik aufzulösen.

In der molekularen Kraftwaage (Molecular Force Balance, MFB) werden DNA-Duplexe zwischen zwei Oberflächen immobilisiert und diese voneinander separiert. Anhand einer Fluoreszenzmarkierung und deren Verbleib auf einer der beiden Oberflächen wird die Stärke der Basenpaarbindungen von zwei DNA-Duplexen im Ensembleexperiment direkt verglichen. Basierend auf Erkenntnissen über das Dehnungsverhalten von Polymeren, welche aus kraftspektroskopischen Einzelmolekülexperimenten gewonnen wurden, ist es gelungen, die Experimente der molekularen Kraftwaage dynamisch nach Zuggeschwindigkeit und Kraftladungsrate auszuwerten. Dabei wurde die Separationsgeschwindigkeit mittels Interferenzkontrastmikroskopie (RICM) gemessen und die Kraftladungsrate, mit der die DNA-Duplexe belastet werden, mittels Monte-Carlo-Simulation berechnet. So konnte ein asymmetrisches Verhalten bei der Trennung von DNA-Duplexen beobachtet werden: Wird bei hohen Geschwindigkeiten (ab $5 \mu\text{m/s}$) an jeden Einzelstrang eines DNA-Duplexes parallel eine Kraft angelegt, so ist dieser stabiler wenn dies an seinen 3'-Enden geschieht als an seinen 5'-Enden. Erklärt wird dieses Verhalten durch das Eintreten in ein kinetisches Regime, in dem unterschiedliche Konformationsänderungen auftreten. Bei niedrigen Geschwindigkeiten hingegen geschieht die Duplextrennung vor allem durch DNA-Blasenbildung, wobei die Rückreaktion (Schließung der Blasen) durch die äußere Kraft verhindert wird.

Neben den Ensembleexperimenten wurden kraftspektroskopische Einzelmolekülexperimente im Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM) durchgeführt. Es wurde das Bindungspotential von 30 Basenpaar langen DNA-Oligomeren vermessen. Außerdem wurde das Dehnungs- und Entspannungsverhalten von doppelsträngiger λ -Phagen-DNA untersucht. Bei der Streckung von DNA sind besonders BS-Übergang (Überstreckung) sowie Schmelzübergang (Einzelstrangbildung) durch charakteristische Kraft-Abstandskurven

im AFM nachzuweisen. Es konnte nun zusätzlich gezeigt werden, dass die Rehybridisierung der DNA bei Kraftrelaxation entscheidend von vorangegangenen Konformationsänderungen abhängt. Insbesondere die Zeit, für die eine bestimmte Kraft im Schmelzübergang anliegt, ist entscheidend für das Vorhandensein und für die Neubildung von Basenpaarungen. Darüberhinaus zeigt sich, dass auch der Schmelzübergang selbst eine Komplexität aufweisen kann.

Große supramolekulare Strukturen wie P-Pili von *Escherichia coli* stellen einerseits eine große Herausforderung für die Durchführung eines AFM-Einzelmolekülexperiments dar, sind aber andererseits ein lohnendes Objekt biophysikalischer Forschung. Sie wurden hier als Teil der *Escherichia coli* Zelle nach ihrem Wachstum in Zellkultur direkt untersucht. Im Experiment muss die Zelle sorgsam immobilisiert werden und Bindungen einzelner P-Pili an den AFM-Cantilever müssen zustande kommen. Das komplexe Streckungs- und Dehnungsverhalten der Pili sowie ihre spezifische Bindung an Glycolipide ist dabei nicht nur mit Hinblick auf ihr Infektionspotential von Interesse. Ihre Reaktion auf hohe Scherkräfte ist auch für Anwendungen in der Bio-Nanotechnologie von Bedeutung. So wurde der Mechanismus zur Rückstapelung der PapA-Untereinheiten zur helikalen Struktur des P-Pilus untersucht. Außerdem wurde die Bindungsstärke der spezifischen Wechselwirkung des Adhäsins PapG an das Glycolipid Galabiose gemessen.

Es konnten also Biomoleküle charakterisiert werden, die den Größenbereich von einigen Nanometern bis zu mehreren Mikrometern umfassen. Dabei wird deutlich, dass nicht nur das Anlegen einer äußeren Kraft von Bedeutung ist, sondern auch die weitere Funktion nach Wegnahme derselben. Erkenntnisse darüber können helfen, die Mechanismen der Selbstorganisation von DNA und Proteinen zu erklären.

Möglich sind neue Erkenntnisse über biologische Moleküle nur durch die stete Weiterentwicklung der Geräte und Versuchsanordnungen. Deshalb wurde die molekulare Kraftwaage in Durchführung und Auswertung erheblich erweitert. Die Möglichkeiten für das Einzelmolekülexperiment im Rasterkraftmikroskop wurden insbesondere durch hochauflösende optische Verfahren wie Quasi-Trans-DIC entscheidend verbessert. So konnten einzelne *Escherichia coli* Zellen dargestellt und direkt mit dem AFM-Cantilever kontaktiert werden.

Desweiteren wurde die Herstellung von Rasterkraftmikroskopen durch schnellen Prototypenbau (Rapid Prototyping) mittels selektivem Lasersintern (SLS) erprobt und zur Anwendung gebracht.

Neben Instrumentenentwicklung, exakter Datenauswertung und Modellberechnungen ist auch die chemische Oberflächenfunktionalisierung für Ensemble- und Einzelmolekülexperiment von großer Bedeutung. Deshalb wurde in zahlreichen Testreihen die Beschichtung von Objektträgern und AFM-Cantilevern mit funktionalisiertem Polyethylenglycol (PEG) optimiert. Es gelang dadurch unerwünschte Wechselwirkungen auf ein Minimum zu reduzieren (Oberflächenpassivierung) und die zu untersuchenden Biomoleküle (DNA-Oligomere) in gewünschter Dichte homogen anzubinden. So konnte die Anzahl der auswertbaren Ereignisse (Kraft-Abstandskurven im AFM, Kontaktfelder im MFB) und deren Relevanz maximiert werden. Es zeigte sich, dass Einzelmolekülexperiment und Ensembleexperiment gleichwertige Methoden sind und sich in der Biophysik gut ergänzen.

Kapitel 1

Einleitung

Der wissenschaftliche Fortschritt und somit die Erlangung von neuem Wissen basiert oftmals auf der Verbindung bestimmter Fachgebiete der Grundlagenforschung. So konnten entscheidende Erkenntnisse über die Entstehung des Universums, seiner Sterne und der chemischen Elemente nur durch die Verbindung von Astronomie und Spektrometrie erlangt werden [1]. Besonders die technischen Geräte in alltäglicher Verwendung setzen physikalische Theorien in Kombination mit Ingenieurskunst um. So basiert jeder CD Spieler auf Einsteins Arbeiten zum Welle-Teilchen-Dualismus von Licht und jedes Satelliten-Ortungssystem würde nicht ohne Beachtung seiner Relativitätstheorie funktionieren. Nicht von ungefähr spricht man deshalb heute von Lebenswissenschaften (engl. Life Sciences) um große interdisziplinäre Forschungsgebiete der Fächer Biologie, Chemie und Physik zu bezeichnen, deren wachsende Bedeutung sich abzeichnet.

Wie Richard P. Feynman schon im Jahre 1959 bemerkete, ist „unten viel Platz“ [2]¹. An der Nutzung dieses Platzes arbeitet insbesondere die Nanowissenschaft, also ein Gebiet in dem Strukturen mit der Größe eines Nanometers ($1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$) relevant sind. Große Fortschritte bei der Herstellung neuer Materialien, elektronischer Komponenten auf dem Gebiet der effizienten Datenspeicherung und vieles mehr sind bereits zu verzeichnen.

Dass aber gerade aus dem Bereich der organischen (belebten) Materie also auf dem Gebiet der Biophysik noch einiges zu erwarten ist, drängt sich durch das bloße Betrachten der Natur auf. Die Speicherung von Information und deren Übersetzung in räumliche Strukturen (DNA, RNA, Proteine, Enzyme)² mit dem Einsatz von molekularen Maschinen scheint hinsichtlich Energieeffizienz, Datensicherung und Reparaturmechanismen perfekt gelöst.

Dass dieses Betrachten möglich ist, ist hochpräzisen Techniken wie Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscope, AFM), Laserpinzette (Laser Optical Tweezers, LOT), Fluoreszenzmikroskopie und anderen zu verdanken.

So konnten im Einzelmolekülexperiment detaillierte Aussagen über Proteinfaltungen mit Zwischenzuständen (nativ, denaturiert und „molten globule“) getroffen werden [3].

¹Die zitierte Literaturangabe ist ein Abdruck der von Richard P. Feynman am 26. Dezember 1959 vor der *American Physical Society* gehaltenen Rede.

²Dabei ist die Trennung von Information und Struktur nicht zwingend, was besonders am Beispiel von RNA zu sehen ist.

Die Nutzbarmachung der Mechanismen des Nanokosmos erscheint vielversprechend und der „Nano-Baukasten“ ein lohnendes Ziel um Materie auf dieser Größenordnung zu beeinflussen. Dass sich gerade auf dieser Skala die belebte Materie so effizient zeigt, scheint zunächst verwunderlich. Denn gerade dort lehrt die Physik, dass alle Vorgänge und damit das „Leben“ an sich unter dem permanenten Einfluß großer Turbulenzen eines zähen Mediums (Wasser) stehen [4].

Doch gerade diese thermische Anregung, die Brownsche Molekularbewegung, von Robert Brown entdeckt und von Albert Einstein und Marian von Smoluchowski theoretisch beschrieben, bildet das Fundament der Prozesse in unseren Zellen [5, 6, 7, 8, 9, 10]. „Brownsche Motoren“ basieren auf der Kombination von thermischer Anregung und (veränderlichen) Unsymmetrien. Dabei wird mit Hilfe chemischer Energie (z.B. Spaltung von ATP) die Bewegung gerichtet [11, 12]. Aber auch die Weitergabe von Information basiert darauf, dass Bindungen (H-Brücken) des DNA Doppelstranges mit angemessenem Aufwand geöffnet und geschlossen werden können. Betrachtet man die Entwicklung von thermischer, chemischer, mechanischer und elektrostatischer Energie mit Bezug auf die Objektgröße, so fällt auf, dass ihr Betrag in der hier betrachteten räumlichen Größenordnung ($10^{-9} m$) konvergiert. Dies bedeutet also die Zugänglichkeit einer Vielzahl von Wechselwirkungen für die beteiligten Moleküle und Strukturen [1].

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, über einen weiten Bereich, von molekularen Strukturen bis hin zu supramolekularen Strukturen der belebten Materie, mögliche Bausteine des „Nano-Baukastens“ mit den Methoden der Physik zu untersuchen. Es wird der Bogen von wenigen 10 Basenpaar langen DNA Molekülen über einige tausend Basenpaar lange λ -Phagen-DNA bis hin zu aus tausenden Proteinen aufgebauten Makromolekülen (P-Pili) gespannt.

Die Untersuchung und Charakterisierung dieser Moleküle mit Hinblick auf eine synthetische Herstellung, Manipulation und zukünftige Verwendung ist ein Ziel dieser Arbeit. Neben Ensembleexperimenten (molekulare Kraftwaage) erlauben die verwendeten Instrumente (Rasterkraftmikroskop) eine aktive Manipulation von einzelnen Molekülen [13]. Dennoch soll dies auch eine Untersuchung der Fähigkeiten der Strukturen zur Selbstorganisation sein. Denn so wie die Zelle sich selbst organisiert, kann auch der Bau von künstlichen molekularen Motoren sich dieser Mechanismen bedienen. Der Aufbau nanoskaliger Strukturen aus einzelnen Bausteinen im sogenannten „bottom-up“ Ansatz erscheint deshalb möglich und nötig. Gerade im Bereich der anorganischen Nanotechnologie wird häufig der umgekehrte Weg, der „top-down“ Ansatz gewählt, um Strukturen zu verkleinern. Eine Trennung dieser beiden Philosophien ist dabei nicht zwingend durch die Art der Objekte, bestehend aus biologischer, organischer oder anorganischer Materie, vorzunehmen. Die maritime Biodiversität zeigt, dass auch lebende Organismen in ihren Zellen Fähigkeiten besitzen, kristalline Strukturen zu erzeugen [14]. Die Physik wird im Bereich der molekularen Mechanismen und zellulären Prozesse entscheidend zum Erkenntnisgewinn beitragen.

Kapitel 2

Instrumente für Einzelmolekül- und Ensemble-Kraftmessungen

2.1 Aufbau und Funktion des AFM-Lichtmikroskop-Hybrids

2.1.1 Das Kraftspektroskop

Die mechanische Untersuchung und Manipulation einzelner Moleküle aber auch einzelner Zellen ist ein vielversprechender Ansatz um über Organisation und Grundlage allen Lebens zu lernen. Es kommen dabei eine Reihe von Methoden zum Einsatz, die sich hinsichtlich Orts- und Zeitauflösung, Handhabung und Aufbau unterscheiden: Optische Pinzette (Optical Tweezers, OT), Magnetische Pinzette (Magnetical Tweezers, MT), Mikropipetten, Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, AFM). Ihnen gemeinsam ist jedoch die Möglichkeit, Einzelmoleküle unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. So können DNA, Antikörper und Proteine ohne Beeinträchtigung ihrer natürlichen Funktion erforscht werden.

Das von Binnig, Quate und Gerber erfundene AFM nimmt hierbei eine besonders prominente Stellung ein [15]. Es wird einerseits als Kraftmikroskop zur dreidimensionalen Abbildung von Oberflächenstrukturen eingesetzt, andererseits dient es als Kraftspektroskop zur Charakterisierung von elastischen und plastischen Eigenschaften einer Probe. In beiden Fällen wird die Verbiegung einer mikroskopischen Blattfeder mittels eines auf ihr reflektierten Laserstrahls detektiert. Im bildgebenden Verfahren wird mit einer feinen Spitze einer Oberfläche abgerastert. Sollen Einzelmoleküle charakterisiert werden, wird ihre Ausdehnung und die dabei entstehenden Kräfte aufgezeichnet.

Das AFM zeichnet sich dabei durch einen weiten Einsatzbereich aus. Die Abbildung von Oberflächen erfolgt mit atomarer Auflösung ($1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ Nanometer (nm)}$). Desweiteren können atomare und molekulare Bindungskräfte von wenigen Pikonewton (pN) bis hin zu kovalenten Bindungen von mehreren Nanonewton (nN) bei einer Zeitauflösung bis zu 10 ms detektiert werden. Es können Moleküle im Nanometer-Bereich und bis zu einer

Ausdehnung von mehreren Mikrometern untersucht werden.

Neben den Instrumenten zur mechanischen Untersuchung von biologischen Proben finden auch andere Einzelmolekültechniken immer größere Verbreitung. Insbesondere die Einzelmolekülfluoreszenz mittels Epi-Fluoreszenz, TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) [16] und konfokalem Laserscanning sind nicht mehr aus der Biophysik wegzudenken. Neue Methoden wie STED (Stimulated Emission Depletion) erhöhen die Effizienz weiter [17]. Eine Kombination optischer und mechanischer Experimente kann den Informationsgewinn bei jedem einzelnen Experiment erheblich steigern.

Bei dem hier verwendeten Aufbau handelt es sich um ein für kraftspektroskopische Messungen optimiertes 1D-AFM in Kombination mit einer hochauflösenden Optik [18]. Der „AFM-Kopf“ steht dazu auf einem Zeiss-Axiomat Inversmikroskop. Er besteht aus dem Cantilever (mikroskopische Blattfeder) mit entsprechender Halterung, einer Laseroptik, einer Zwei-Segment Photodiode zur Laserdetektion, sowie einem senkrecht angebrachten z-Piezo, der einen von drei Standfüßen darstellt. Die Steuerung und Signalauslesung der elektronischen Komponenten erfolgt mittels PC und Software. Die Daten werden über PCI-Schnittstelle eingelesen und mit der „MFP-1D“ Software (Asylum Research Inc.) basierend auf „Igor-Pro“ (Wavemetrics Inc.) verarbeitet. Der Aufbau ist schematisch in Abbildung 2.1 zu sehen. Der gesamte Aufbau wird zur Schwingungsdämpfung mittels Bungeeseilen

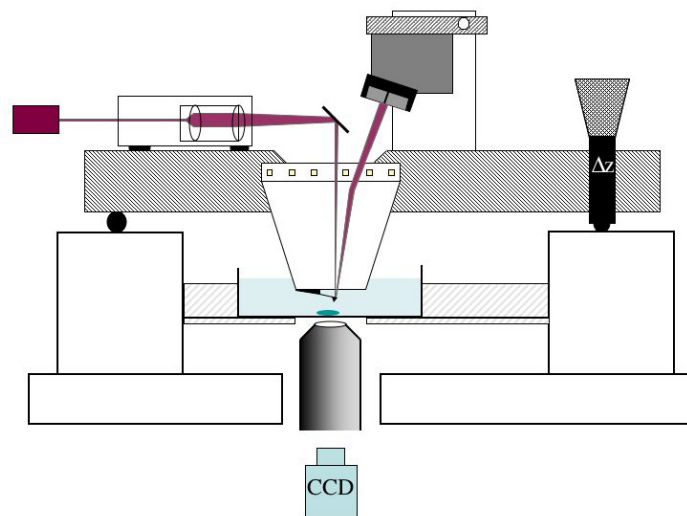


Abbildung 2.1: Hybrid-Aufbau von Rasterkraftmikroskop (AFM) und Lichtmikroskop.

an der Zimmerdecke aufgehängt [19, 20]. Der besonders massive und schwere Bau des Lichtmikroskops erweist sich hierfür als vorteilhaft.

In das Inversmikroskop wurde die Möglichkeit zur Epi-Fluoreszenzmikroskopie, zur Phasenkontrastmikroskopie sowie zur Differentiellen Interferenzkontrastmikroskopie (DIC) integriert [18]. Von Bedeutung für die hier dargestellten Experimente ist insbesondere Letztere, die als „Quasi-Trans DIC“-Verfahren das genaue Lokalisieren von einzelnen Bakte-

rienzen unter dem AFM-Cantilever ermöglicht. Der Cantilever bzw. „AFM-Kopf“ kann dabei mittels Zwei-Ebenen-Mikrometertisch über dem Mikroskopobjektiv positioniert werden und unabhängig davon kann die Probe (Zellen) unter der Cantileverspitze ausgerichtet werden.

2.1.2 Das Invers-Lichtmikroskop

Im Folgenden seien die lichtmikroskopischen Komponenten erwähnt, die in dem verwendeten Aufbau integriert wurden. Es handelt sich dabei um kontrastverstärkende Verfahren zur Sichtbarmachung dünner biologischer Proben [21]. Sie erleichtern nicht nur die Durchführung von Kraftspektroskopie-Experimenten sondern können weitere Informationen über die untersuchten Objekte liefern. Sie werden dazu simultan oder in Serie zur AFM-Messung eingesetzt. Das Auflösungsvermögen d eines Objektivs, also der kleinste Abstand zur getrennten Wahrnehmung zweier Punkte, ist nach Ernst Abbe definiert durch

$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot N.A.} = \frac{\lambda}{2 \cdot n \cdot \sin \alpha} \quad (2.1)$$

mit λ = Wellenlänge der Beleuchtung, $N.A.$ = numerische Apertur, n = Brechzahl des Mediums, α = Halber Öffnungswinkel des Objektivs. Die „klassische“ Lichtmikroskopie beschränkt sich also auf Objekte, die nicht kleiner als $d \approx 200 \text{ nm}$ sind [22, 23]. Dies bedeutet, dass Zellen aber nicht mehr einzelne Moleküle sichtbar sind. Es können jedoch noch kleinste Bakterienzellen wie *Escherichia coli* scharf abgebildet werden. Die Fluoreszenzmikroskopie unterliegt natürlich nicht direkt dieser Auflösungsgrenze, da sie lichtemittierende Objekte wie zum Beispiel einzelne fluoreszenzmarkierte Aktinfilamente vor einem dunklen Hintergrund darstellt.

2.1.2.1 Epi-Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine der wichtigsten Methoden zur Untersuchung biologischer Vorgänge und einzelner Moleküle [24]. Die Epi-Fluoreszenz und ihre Weiterentwicklungen wie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) [16] und STED (Stimulated Emission Depletion) [17] werden in Biologie und Physik auch verstärkt in Verbindung mit Kraftmessungen eingesetzt.

Bei der Fluoreszenz wird ein Elektron eines Atoms oder Moleküls durch Absorption eines Photons in einen höheren Zustand gehoben. Von dort relaxiert es in einen Zwischenzustand und fällt unter Emission eines Photons in den Grundzustand (innerhalb 10^{-8} s). Die Emissionstrahlung besitzt folglich eine größere Wellenlänge als die Anregung (Stokes Verschiebung). Der Strahlengang im Mikroskop ist schematisch in Abbildung 2.2a dargestellt. Die Anregungswellenlänge wird mittels eines Bandpasses (BP) aus dem Leuchtspektrum der Lichtquelle gefiltert und über einen dichroitischen Spiegel (Strahlteiler ST) und das Objektiv auf die Probe geleitet. Das von der Probe emittierte Licht passiert den Strahlteiler welcher ab einer gewissen Wellenlänge transmittierend ist und einen weiteren

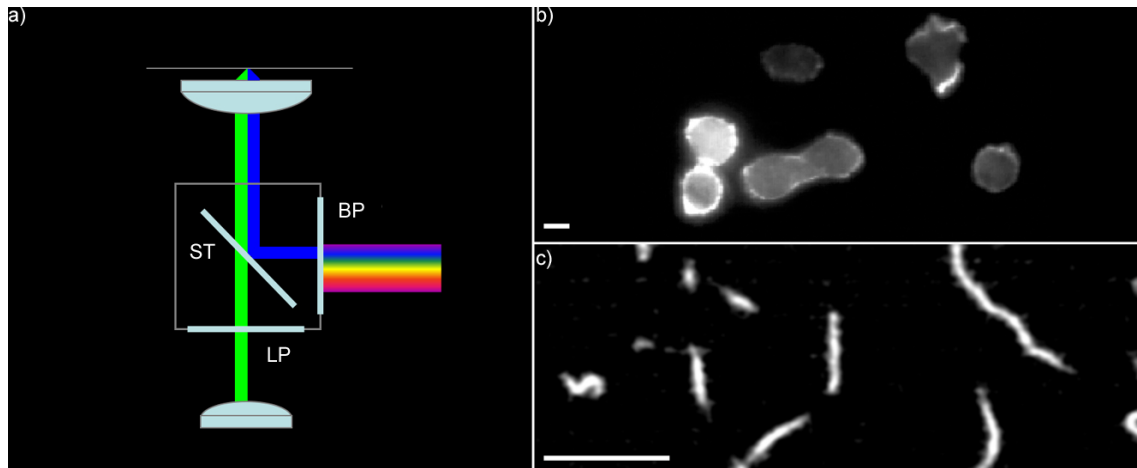


Abbildung 2.2: a) Epi-Fluoreszenz-Strahlengang (BP = Bandpass, LP = Langpass, ST = Strahlteiler). b) Fluoreszenzmarkierte *Dictyostelium Discoideum* Zellen. c) Fluoreszenzmarkierte Aktin-Filamente. Der weiße Balken entspricht 10 μm .

Langpass, welcher verbleibende Anregungsbeleuchtung ausfiltert. Schließlich wird das Signal mittels Okular oder CCD-Kamera aufgezeichnet. Zusätzlich können Infrarotfilter bei Anregung und Emission eingesetzt werden um Probenschädigung zu verhindern oder um andere Störungen wie eine Fluoreszenz des AFM-Cantilevers im Bildausschnitt zu eliminieren. Um Zellen und deren Organellen auf diese Art zu studieren, müssen sie natürlich mit fluoreszierenden Farbstoffen oder Proteinen markiert werden, sofern sie keine Eigenfluoreszenz zeigen. Weit verbreitet ist das GFP (Grün Fluoreszierendes Protein), ein ursprünglich aus *Aequorea Victoria* extrahiertes Protein welches sich mit einer Vielzahl von anderen Proteinen genetisch fusionieren lässt [25, 26, 27]. Abbildung 2.2b zeigt Zellen des Schleimpilzes *Dictyostelium Discoideum* [28]. Mit Hilfe des ARP2/3 Komplexes (Actin Related Protein) wurde polymerisiertes Aktin mit GFP fluoreszenzmarkiert [29, 30]. Da kein monomeres Aktin markiert ist, können morphologisch aktive Regionen, die z.B. bei der Fortbewegung auftreten (Leading Edges), gut erkannt werden. In Abbildung 2.2c ist die Momentaufnahme einzelner Aktinfilamente zu sehen, die sich über eine mit Myosin beschichteten Oberfläche unter ATP-Verbrauch (Adenosintriphosphat) bewegen. Dieser der Muskelkontraktion zugrundeliegende Mechanismus stellt einen anschaulichen molekularen Motor dar [31]. Um das Zerfallen der Filamente zu verhindern und um sie fluoreszent zu markieren wurde TRITC (Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate) markiertes Phalloidin aus *Amanita Phalloides* verwendet. Die Filtersätze des Mikroskops sind entsprechend dem verwendeten Farbstoff zu wählen.

2.1.2.2 LED-Ring Phasenkontrastmikroskopie

Die Hellfeldmikroskopie bildet amplitudenmodulierende Objekte ab. Die Hell-Dunkel-Unterschiede werden im Mikroskop dargestellt. Im Gegensatz dazu besitzen viele biologische

Proben, wie zum Beispiel dünne Epithelzellen, nur die Eigenschaft durch Regionen unterschiedlicher optischer Dicke das Licht in seiner Phase zu verändern. Man nennt sie deshalb Phasenobjekte und sie sind mit Hellfeldbeleuchtung kaum sichtbar [32]. Das Phasenkontrastverfahren wandelt nun die Phasenmodulation in eine Amplitudenmodulation um [33, 34, 35]. Dies geschieht indem man das Objekt durch eine ringförmige Blende im Kondensor beleuchtet. Man erhält dann eine Lichtwelle der ursprünglichen Beleuchtung E_I sowie eine vom Objekt gebeugte E_{II} welche miteinander interferieren. Letztere ist von geringerer Intensität und um $\frac{\lambda}{4}$ bzw. $\frac{\pi}{2}$ phasenverzögert. Man bringt nun in der hinteren Brennebene des Objektivs einen Phasenring ein, welcher den dort scharf abgebildeten Kondensorring exakt überlagert. Der Phasenring ist metallisch bedampft und optisch dünner als die Glasfläche auf der er sich befindet. Dies führt dazu, dass die Beleuchtungswelle E_I in ihrer Amplitude geschwächt und um $\frac{\pi}{2}$ beschleunigt wird. Dies führt zu einer sichtbaren destruktiven Interferenz mit der gebeugten Welle E_{II} . Dadurch erscheinen Regionen die dicker sind oder einen höheren Brechungsindex als ihre Umgebung besitzen dunkel. Da der AFM-Hybrid-Aufbau über dem Inversmikroskop keine Kondensorbeleuchtung zulässt, wurde der Kondensorring durch eine LED-Ring Beleuchtung ersetzt (Abbildung 2.3a). Diese wurde direkt im Plexiglas-Cantileverhalter (Fluidzelle) des „AFM-Kopfes“ integriert. Der Ring besteht aus zwölf Surface-Mount LEDs (QTLP650C-Y, smLED, ultra-miniature chip type 1206, AlInGaP, $I = 20\text{ mA}$, $\lambda = 590\text{ nm}$, Fairchild Semiconductor Inc.). Ihre Anordnung auf einer ringförmigen, schrägen Fräsung wurde hinsichtlich Neigungswinkel und Durchmesser exakt auf den Phasenring im Objektiv abgestimmt. Abbildung 2.3b zeigt eine

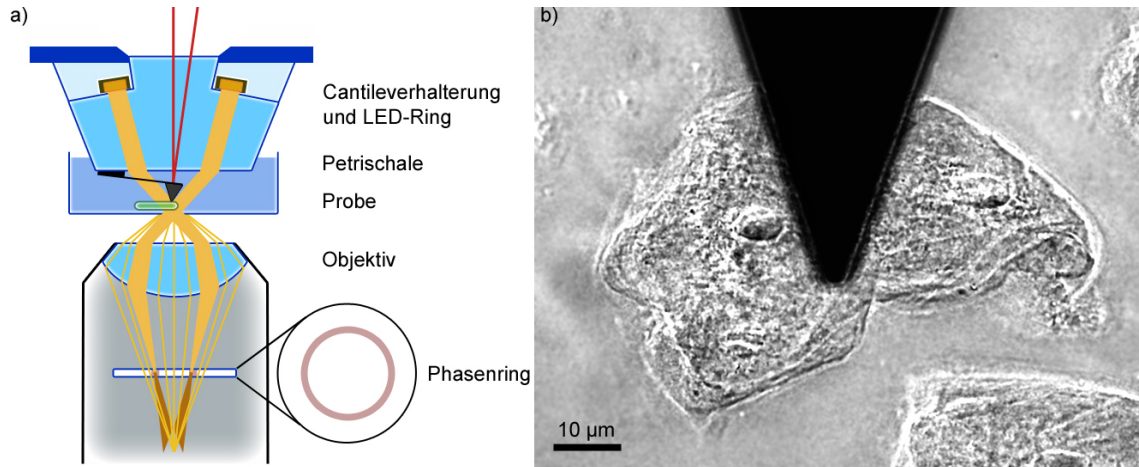


Abbildung 2.3: a) Strahlengang der LED-Ring Phasenkontrastmikroskopie. b) Aufnahme mehrerer Epithelzellen und des AFM-Cantilevers.

Phasenkontrastaufnahme mehrerer menschlicher Epithelzellen und eines AFM-Cantilevers. Zu erkennen sind der Zellkern und die Organellen. Da der Cantilever natürlich eine Schatten erzeugt ist dieses Verfahren besonders geeignet um die äußere Form einer Zelle als Reaktion auf mechanische Reize abzubilden.

2.1.2.3 Quasi-Trans DIC Mikroskopie

Eine weitere wichtige Mikroskopiertechnik ist das Differentielle Interferenz Kontrastverfahren (DIC). Es dient in Transmissionsbeleuchtung wie das Phasenkontrastverfahren zur Sichtbarmachung dünner biologischer Proben und in Epi-Beleuchtung zur Untersuchung reflektierender Proben wie Halbleiterchips [21, 32]. Das DIC Verfahren wurde nun so weiterentwickelt, dass biologische Objekte unterhalb einer reflektierenden Fläche in Epi-Beleuchtung¹ beobachtet werden können. Diese Kombination der beiden herkömmlichen Verfahren wird Quasi-Trans DIC genannt und ermöglicht eine hochauflösende Abbildung des Bereichs direkt unterhalb des AFM-Cantilevers oder Cantileverchips. Abbildung 2.4a zeigt den Strahlengang im Quasi-Trans DIC Verfahren. Das von der Quelle kommende Licht wird durch einen Polarisator linear polarisiert. Beim Durchlaufen des Nomarski Prismas wird die Welle in zwei zueinander senkrecht polarisierte Wellen aufgespaltet, welche in geringem Abstand zueinander (unter der Auflösungsgrenze des Objektivs) das Objekt durchlaufen. Die Strahlen werden reflektiert und zurück in das Objektiv gelenkt. Sie durchlaufen erneut das Nomarski Prisma und werden dadurch wieder zu einer Welle zusammengeführt. Haben beide Wellen einen Ort gleicher optischer Dicke durchlaufen, sind ihre Phasenverschiebungen also identisch, so entsteht wieder eine linear polarisierte Welle. Haben sie jedoch Orte unterschiedlicher optischer Pfadlänge durchlaufen, so entsteht im Nomarski Prisma eine elliptisch polarisierte Welle. Diese durchläuft den Analysator (linearer Polarisator) welcher so orientiert ist, dass der Teil der Welle, welcher der ursprünglich Linearen entspricht, herausgefiltert wird. Der Rest der elliptisch polarisierten Welle wird durchgelassen. Diese lineare Welle erzeugt das Bild in der Bildebene durch Interferenz. Abbildung

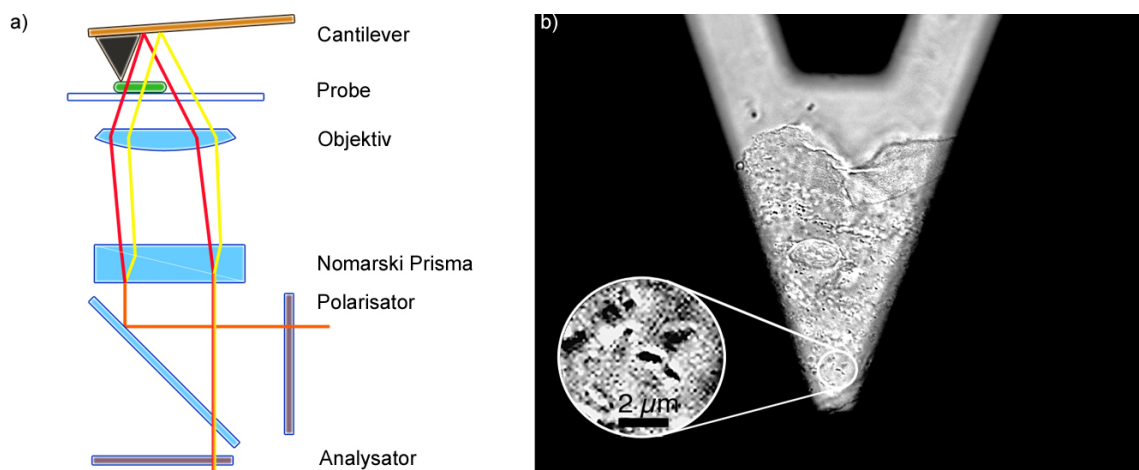


Abbildung 2.4: a) Strahlengang der Quasi-Trans DIC Mikroskopie. b) Aufnahme einer Epithelzelle unterhalb des reflektierenden Cantilevers.

2.4b zeigt eine Aufnahme einer Epithelzelle unterhalb des AFM-Cantilever. Im Gegensatz zum Phasenkontrastverfahren, welches das Bild als Unterschied zwischen Störung und

¹„Epi“ bedeutet die Beleuchtung und Beobachtung (durch das Objektiv) von derselben Seite.

Referenzbeleuchtung darstellt, bildet das DIC Verfahren einen Gradienten der Optischen Pfaddifferenz ab. Es entsteht dadurch ein pseudo-dreidimensionales Bild welches aber keine Aussage über die tatsächliche optische Dicke zulässt. Das Verfahren wurde wegen des hohen erreichbaren Kontrastes besonders dazu verwendet um einzelne *Escherichia coli* Zellen unter der Cantileverspitze zu lokalisieren.

2.1.3 Piezo-Kalibrierung

Nach Fertigstellung des Versuchsaufbaus ist es einmalig nötig, den piezoelektrischen Aktor (z-Piezo) exakt zu eichen, d.h. die Steuerung so zu kalibrieren, dass der z-Piezo das korrekte Spannungssignal zur Ausführung des gewünschten Fahrwegs (Änderung des Abstands Cantilever-Substrat) erhält. Dazu wird der Spot des Detektionslasers so auf den Rand des Cantilevers positioniert, dass er von diesem und von einem darunterliegenden goldbedampften Objektträger (Slide) reflektiert wird. Der Objektträger ist dabei im gleichen Winkel ($\varphi = 6^\circ$) geneigt wie der Cantilever aufgrund seines Einbaus in der Plexiglashalterung. Es kommt dadurch zu einer Interferenz, die in der Zweisegment-Photodiode detektiert werden kann. Führt der Cantilever eine Auf- oder Abwärtsbewegung aus (durch Expansion oder Kontraktion des z-Piezoes), so entsteht dadurch jeweils eine sinusförmige Intensitätsmodulation [36]. Dieser Effekt kann auch durch diffuse Reflexion, bei der Verwendung eines Reflektors mit rauher Oberfläche erreicht werden. Abbildung 2.5 zeigt die Eichung der Cantileverbewegung und damit der x-Achse zukünftiger Kraft-Abstandskurven mittels Interferenzverfahren. Die Wellenlänge λ des Sinusmusters (oder Vielfache) muss gemäß der

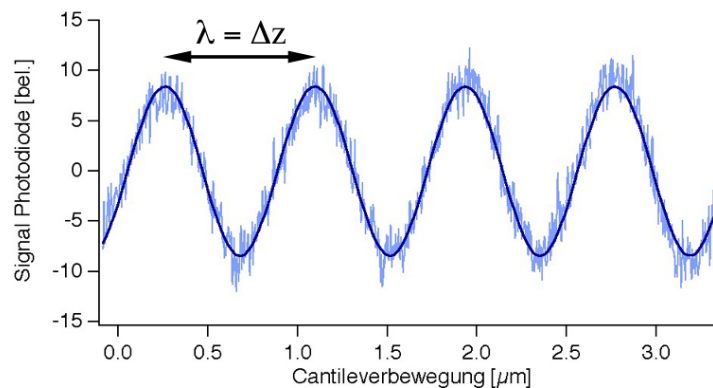


Abbildung 2.5: Interferenzmuster des Detektionslasers durch Reflexion an Cantilever und Gold-Slide. Über die bekannte Wellenlänge Λ des Diodenlasers wird die tatsächliche Bewegung des Cantilevers ermittelt, also die x-Achse geeicht.

Gleichung

$$\Delta z = \lambda = \frac{N \cdot \Lambda}{2 \cdot n \cdot \cos^2 \varphi} \quad (2.2)$$

(Λ = Wellenlänge des Lasers, N = Anzahl der aufgezeichneten Wellenlängen, n = Brechungsindex des Mediums) der Cantileverbewegung entsprechen. Da Δz die Bewegung des

Cantilevers angibt, gilt für die tatsächliche Ausdehnung Δz_{Piezo} des Piezoaktors wegen der Geometrie des „AFM-Kopfes“:

$$\Delta z_{Piezo} \approx 2 \cdot \Delta z. \quad (2.3)$$

Für eine detaillierte Beschreibung siehe [36].

2.1.4 Eichung der Federkonstante des Cantilevers

Das wichtigste Element im Aufbau des AFMs stellt die mikroskopische Blattfeder (engl. Cantilever) dar. Durch ihre Verbiegung liefert sie die Informationen über Kräfte im Bereich von einigen Pikonewton. Sie besitzt eine feine Spitze senkrecht zur Längsachse welche durch Metallbedampfung oder chemische Modifikation zur Anbindung von Molekülen geeignet ist (siehe Abbildung 2.6). Entscheidend für eine gute Auflösung von Kräften im Pikonewton-

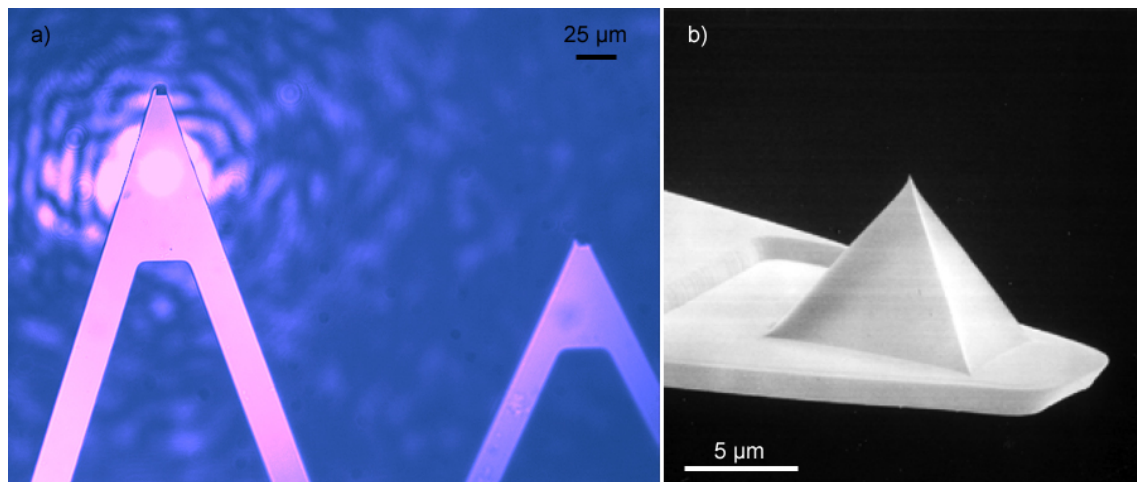


Abbildung 2.6: a) Lichtmikroskopieaufnahme zweier AFM Cantilever. Auf dem linken Cantilever ist der Fokus des Infrarot-Detektionslasers zu sehen. b) Raster-Elektronenmikroskop-Aufnahme der Spitze eines Si_3N_4 Cantilevers (Veeco Inc.).

Bereich ist neben der Schall- und Schwingungsisolierung des gesamten Aufbaus besonders das Resonanzverhalten des Cantilevers bei thermischer Anregung. Es gilt, dass jeder Freiheitsgrad eines thermodynamischen Systems die Energie $\frac{k_B T}{2}$ besitzt. Beschreibt man also die Schwingung des Cantilevers als harmonische Oszillation, so folgt

$$\frac{k_c \cdot \langle x^2 \rangle}{2} = \frac{k_B T}{2}. \quad (2.4)$$

Die mittlere quadratische Auslenkung $\langle x^2 \rangle$ ist also umgekehrt proportional zur Federhärte k_c :

$$\langle x^2 \rangle = \frac{k_B T}{k_c}. \quad (2.5)$$

Andererseits ist die mittlere quadratische Kraftfluktuation $\langle F^2 \rangle$ proportional zur Federhärte:

$$\langle F^2 \rangle = k_c^2 \cdot \langle x^2 \rangle = k_B T \cdot k_c. \quad (2.6)$$

Man erhält also eine „thermische Unschärferelation“

$$\langle F \cdot x \rangle = k_B T. \quad (2.7)$$

Dies bedeutet, dass mechanische Stabilität, also geringe mittlere Auslenkung mit harten Cantilevern, eine Detektion kleiner Kräfte aber mit weichen Cantilevern zu erreichen ist [37]. Die Cantilever werden vor allem thermisch zu Schwingungen mit ihrer Resonanzfrequenz angeregt. Es wird deshalb versucht Cantilever mit geringer Federkonstante jedoch hoher Resonanzfrequenz einzusetzen, die innerhalb eines Zeitraumes viele eigene Schwingungszyklen durchlaufen [37]. So wird ihre Fluktuation stark gemittelt und Schall koppelt nur in geringerem Maße ein. Es können so Kräfte von wenigen Piconewton und einer Zeitauflösung von einigen Millisekunden gemessen werden.

Bei jeder Messung mit einem neuen Cantilever ist es nötig, dessen Federkonstante k_c zu bestimmen. Die Methode des thermischen Rauschens hat sich hierzu etabliert [38, 39, 40]. Unter Berücksichtigung einiger Randbedingungen, wie der Tatsache, dass die Verbiegung des Cantilevers gemessen wird und weniger dessen tatsächliche Auslenkung, lässt sich die Federkonstante durch

$$k_c = 0,8 \cdot \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle} \quad (2.8)$$

berechnen [41]. Man nimmt dazu das Rauschspektrum des Cantilevers (in Wasser) auf und integriert über die erste Resonanz. Abbildung 2.7 zeigt das Rauschspektrum (spektrale Dichte) eines Cantilevers in doppelt logarithmischer Darstellung mit der ersten Grundschwingung und der ersten Oberschwingung. Mit Hilfe des Parsevalschen Theorems

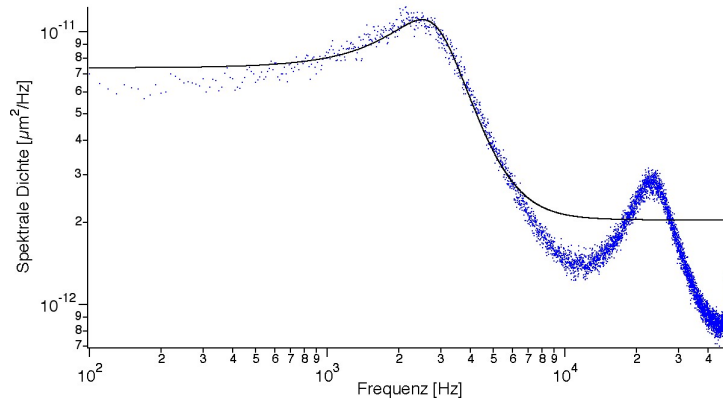


Abbildung 2.7: Spektrale Dichte (Power Spectral Density, PSD) eines Cantilevers (blau) und Fit an die erste Resonanz (schwarz).

$$\int |x(t)|^2 dt = \int |x(\omega)|^2 d\omega \quad (2.9)$$

kann man das mittlere Auslenkungsquadrat in Abhängigkeit der Frequenz betrachten. Um die Federkonstante des Cantilevers bestimmen zu können muss zunächst das Spannungssignal der Zwei-Segment Photodiode ($a - b$) in ein Längenmaß übersetzt werden. Mittels z-Piezo drückt man dazu den Cantilever auf eine harte Oberfläche. Man erhält so einen linearen Zusammenhang zwischen Photodiodensignal und Länge (Inverted Optical Lever Sensitivity, InvOLS). Abbildung 2.8 zeigt eine solche Eindrückkurve. Der Kontakt des Cantilevers mit einer harten Oberfläche (Objektträger) ist durch den linearen Anstieg des Detektorsignals zu erkennen. Es gilt also für die Signalverarbeitung bis zur Kraftmessung:

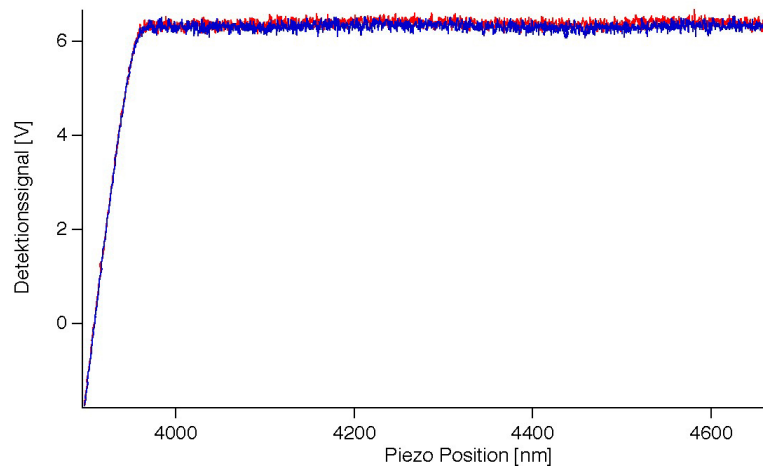


Abbildung 2.8: Eindrückkurve eines Cantilevers auf harter Oberfläche zur Ermittlung der optischen Cantilever-Sensitivität.

$$\text{Photodiodensignal}_{a-b} [V] \cdot \text{InvOLS} [nm/V] = \text{Auslenkung} [nm] \quad (2.10)$$

$$\text{Auslenkung} [nm] \cdot k_c [pN/nm] = \text{Kraft} [pN] \quad (2.11)$$

2.1.5 Kraft-Abstandskurven

Bindet man ein Polymer zwischen eine Substratoberfläche und einen Cantilever um dieses zu dehnen, so entspricht dies einer Hintereinanderschaltung zweier Federn. Die Elastizität des Cantilevers ist also zunächst in den aufgenommenen Daten mit enthalten (Abbildung 2.9a). Um nun die Streckung des Polymers zwischen Substrat und Cantileverspitze zu erhalten, muss aus den geeichten Rohdaten, welche Kraft $F(t)$ gegen Piezoweg $z(t)$ liefern, die Cantileververbiegung abgezogen werden. Der tatsächliche Abstand der Cantileverspitze

von der Probe bzw. die Ausdehnung eines Polymers $d(t)$ berechnet sich demnach als

$$d(t) = z(t) - \frac{F(t)}{k_c} \quad (2.12)$$

mit der Federkonstante k_c des Cantilevers. Trägt man die gemessene Kraft $F(t)$ gegen den Abstand Cantilever-Substratoberfläche $d(t)$ wie in Abbildung 2.9b auf, so erhält damit die Kraft-Abstandskurve.

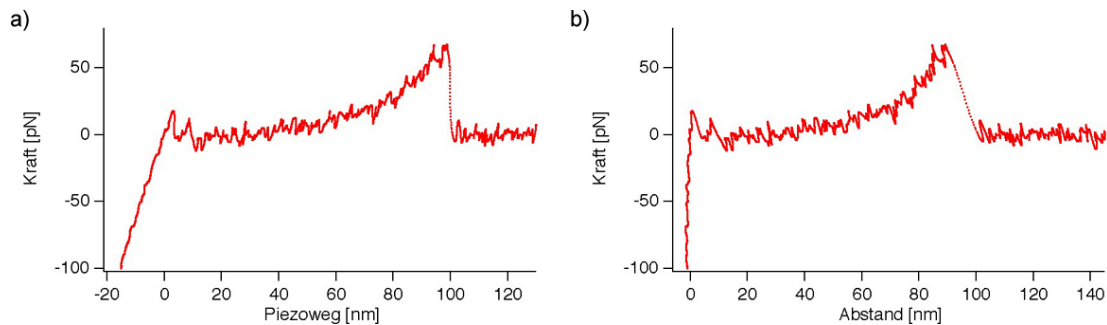


Abbildung 2.9: a) Kraft gegen Piezoweg. b) Kraft-Abstandskurve nach Subtraktion der Cantileverbiegung.

2.2 Das Plastic-AFM

Das AFM bzw. das 1D-Kraftspektroskop hat sich als zuverlässiges Werkzeug zur Untersuchung von Einzelmolekülen und Oberflächenstrukturen erwiesen. Auch wenn es sich bei einem solchen Rasterkraftmikroskop um ein langlebiges Investitionsgut handelt, stellt seine Anschaffung insbesondere für junge Forschergruppen eine erhebliche finanzielle Belastung dar. Zudem bedeutet der Kauf eines kommerziell erhältlichen Produktes meist große Einschränkungen hinsichtlich Modifikationen und Erweiterungen, da es sich größtenteils um sehr abgeschlossene Systeme handelt. Der Selbstbau eines AFM-Systems bietet hier mehr Freiheiten (siehe oben). Dabei ist es üblich die einzelnen Komponenten durch CNC-Fräsung² metallischer Materialien wie Aluminium zu fertigen. Ergänzt wird der Aufbau durch optische Linsen, Piezoaktoren und elektronische Komponenten sowie digitale Datenverarbeitung. Alternativ zur Bearbeitung massiver Materialblöcke hat sich das „Rapid Prototyping“ (schneller Prototypenbau) in den letzten Jahren entwickelt. Man subsumiert darunter Fertigungsverfahren, die schnell und effizient, ein dreidimensionales Werkstück aufbauen. Als Vorlage dienen digitale technische Zeichnungen (CAD, Computer Aided Design). Neben der Herstellung von physischen Modellen (Concept Modeling) werden einsetzfähige Werkzeuge (Rapid Tooling) und komplette Fertigteile (Rapid Manufacturing)

²Computerized Numerical Control (CNC)

hergestellt. Die unterschiedlichen Verfahren sind zum Beispiel Stereolithografie, selektives Lasersintern, Fused Deposition Modeling und andere. Es können damit zahlreiche Ausgangsmaterialien wie Duomere, Thermoplaste, Metalle und Polycarbonate bearbeitet werden. Es ist dabei möglich, komplexe dreidimensionale Strukturen mit geringeren räumlichen Einschränkungen als bei herkömmlicher CNC-Fräsung zu fertigen. Dennoch ist die Exaktheit ihrer Maße nicht schlechter. Eine unkomplizierte Entwicklungsumgebung am PC ermöglicht es, die gewünschten Objekte vor ihrer eigentlichen Herstellung dreidimensional zu planen. Änderungen sind einfach möglich.

Es wurde nun ein „AFM-Kopf“ durch selektives Lasersintern (SLS) hergestellt [42]. Seine Eigenschaften wurden mit denen des aus Aluminium gefrästen „AFM-Kopfes“ verglichen. Beim selektivem Lasersintern wird Schicht für Schicht eines Materialpulvers durch einen starken Laser geschmolzen. Nach jedem Durchgang wird das Fertigungsbett abgesenkt und eine weitere Schicht Pulver aufgetragen. Es können so Strukturen mit einer Genauigkeit von $100\text{ }\mu\text{m}$ geschaffen werden. Die elektronischen Komponenten wie z-Piezo, Laseroptik und Photodiode wurden aus dem Aluminium-Gerät entnommen. So konnten beide Geräte miteinander verglichen werden.

Die limitierende Störgröße bei AFM Messungen ist das Cantileverrauschen durch thermische Anregung. Jedoch können auch Gebäudeschwingungen und akustische Schwingungen in das System einkoppeln. Unter gleichen Bedingungen wurden deshalb von „Plastic-“ und „Aluminium-AFM“ jeweils ein Rauschspektrum des freien Cantilevers und mit Berührung einer Probenoberfläche aufgezeichnet (beides in Wasser). Es zeigen sich dabei keine signifikanten Unterschiede in Amplitude (oder Integral) oder Form des Rauschspektrums. Lediglich eine minimale Verschiebung einzelner Peaks zu niedrigeren Frequenzen ist erkennbar (siehe Kühner et al. [42]). Außerdem wurden zwei im Ergebnis identische Kraft-Abstandskurven mit Oberflächenberührung (Eindrückkurve) aufgezeichnet.

Um das Langzeitverhalten sowie Eichung und Reproduzierbarkeit zu testen wurden einige kraftspektroskopische Messungen an Einzelmolekülen durchgeführt. Diese wurden bereits durch frühere Studien ausgiebig untersucht. Besonders geeignet sind hier das Muskelprotein Titin [43] sowie die aus einigen tausend Basenpaaren bestehende λ -Phagen-DNA [44, 45]. Diese relativ großen Moleküle weisen gut definierte Entfaltungs- und Übergangszustände auf, die auch für Kraft- und Längeneichungen des Messgerätes herangezogen werden können.

Abbildung 2.10 zeigt die Kraft-Abstandskurve einer λ -Phagen-DNA. Bei Streckung ist das BS-Plateau zu erkennen (blaue Kurve) und die Rückfahrkurve (schwarz) zeigt die Einzelstrangcharakteristik der DNA nach einem Schmelzübergang [44, 45]. Bei null Kraft hybridisieren beide Stränge wieder und der Zyklus kann von neuem durchlaufen werden. Dies erfolgt bei guter Anbindung der DNA an Cantilever und Substrat mit hoher Wiederholbarkeit. Es sind weitere Kurven nach 300 und 650 Durchläufen gezeigt. Abbildung 2.11 zeigt die Kraft-Abstandskurve eines GFP-Titin-Fusionsproteins [46, 47, 26, 25]. Zusätzlich zu der Entfaltung der Immunglobulin (Ig)-Domänen ist die Entfaltung des GFP-Proteins bei 72 nm zu sehen. Danach folgen die Ig-Domänen des Titins in diskreten Schritten von 32 nm . Beide Abbildungen zeigen also die Stabilität und Reproduzierbarkeit von Messungen mit dem Plastic-AFM.

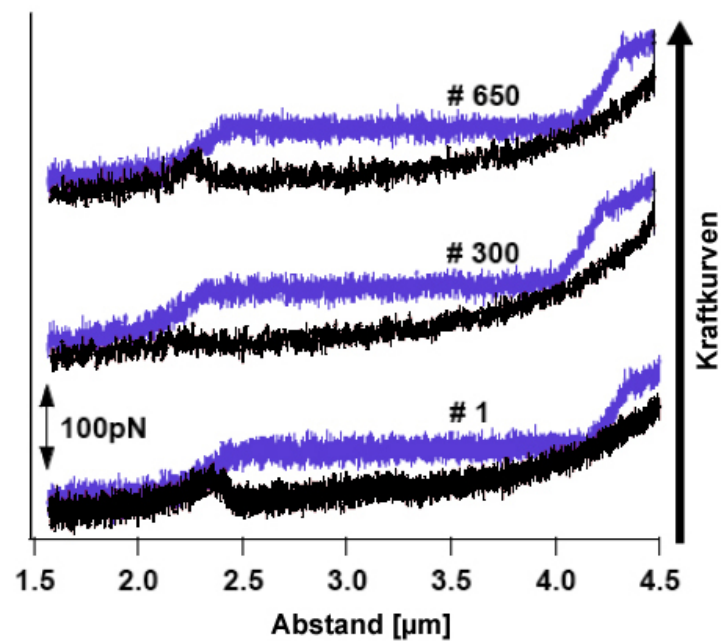


Abbildung 2.10: Kraft-Abstandskurve von doppelsträngiger λ -Phagen DNA aufgenommen mit Plastic-AFM. Streckung (blau) sowie Rückfahrkurve (schwarz) nach einem, 300 und 650 Zyklen desselben Moleküls.

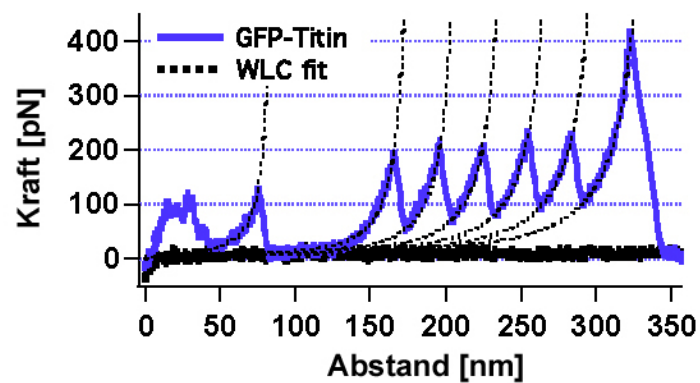


Abbildung 2.11: Kraft-Abstandskurve der Entfaltung von GFP-Titin. Schwarze gestrichelte Linie: Worm-Like Chain (WLC) Fit.

2.3 Die molekulare Kraftwaage

2.3.1 Aufbau und Funktion der molekularen Kraftwaage

Das von Albrecht et al. [48] entwickelte Verfahren der molekularen Kraftwaage (Molecular Force Balance, MFB) ist eine hochempfindliche Methode zur vergleichenden Ensemblesmessung molekularer Bindungskräfte. Es werden dabei zwei oligomere DNA-Duplexe hintereinander gekoppelt und zwischen zwei Oberflächen angebunden. Bei der Trennung dieser Oberflächen kommt es zur Öffnung der schwächeren Bindung. Eine mittig angebrachte Fluoreszenzmarkierung zeigt dann, welche der Bindungen die stabilere war, je nachdem auf welcher der beiden Oberflächen sie nachzuweisen ist. Abbildung 2.12 zeigt das Prinzip dieser Waage. Im Experiment sind eine Vielzahl dieser Waagen zwischen den Flächen an-

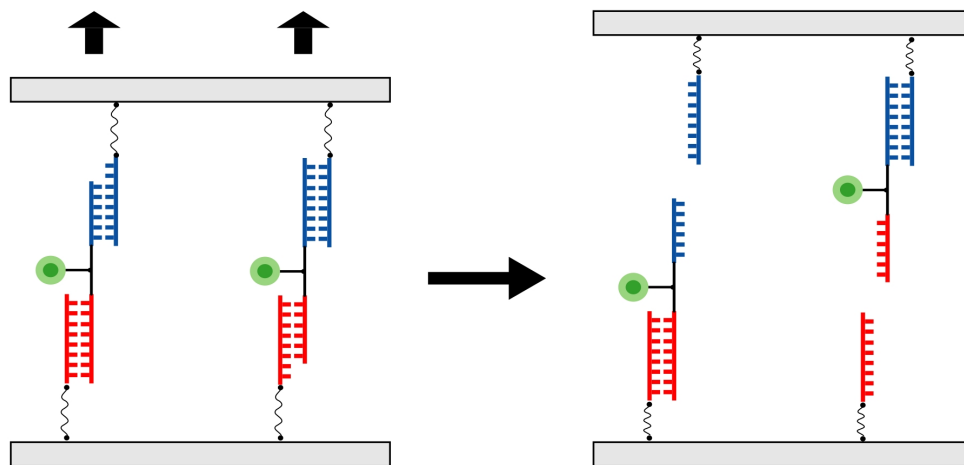


Abbildung 2.12: Funktionsweise der molekulare Kraftwaage (MFB). Im Ensemble werden zwei DNA-Duplexe (rot und blau) miteinander verglichen. Der Verbleib des Fluoreszenzmarkers (grün) zeigt den stabileren Duplex an.

gebunden, so dass die Fluoreszenzintensität und damit die Überlebenswahrscheinlichkeiten im Ensemble ausgelesen werden können. Ist die Stabilität beider Duplexe unter Anlegung einer äußeren Kraft gleich groß, so ist der Marker mit einer Wahrscheinlichkeit von jeweils 50 % an einer der beiden Oberflächen zu finden. Ist die Waage unsymmetrisch, zum Beispiel aufgrund unterschiedlicher Basenanzahl, Basenfehlpaarungen, gebundenen Interkalatoren etc., so verschiebt sich die Wahrscheinlichkeit entsprechend [49].

Abbildung 2.13 zeigt den Ablauf eines Experiments mit der molekularen Kraftwaage. Zu Beginn werden die DNA-Duplexe auf getrennten Feldern auf einem Objektträger angebunden. Dies geschieht indem ein Einzelstrang mit einem funktionalisiertem Ende chemisch angebunden wird und die komplementären Teile hybridisieren. Diese sind an ihrem freien

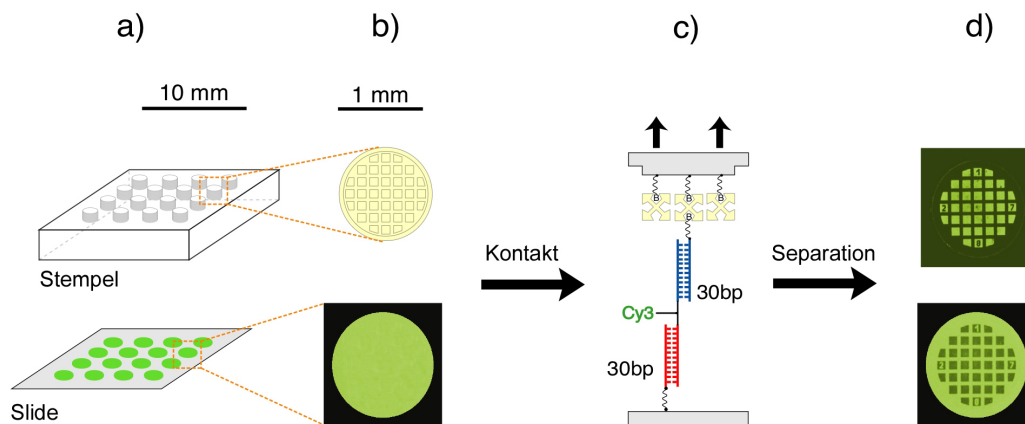


Abbildung 2.13: Ablauf und Prinzip der molekularen Kraftwaage. a) Die DNA-Duplexe werden auf einem Objektträger angebunden. b) Ein funktionalisierter und strukturierter PDMS-Stempel wird in Kontakt mit den homogen angebundenen DNA-Oligomeren gebracht. c) Nach dem Kontakt werden die Flächen separiert. d) Die Cy3-Fluoreszenzmarkierung wird mittels Laserscanner ausgelesen.

Ende mit Biotingruppen versehen. Die chemische Anbindung ist ausführlicher in Kapitel 3 beschrieben. Ein mit Streptavidin funktionalisierter PDMS³-Stempel wird nun mit dem Objektträger in Kontakt gebracht und bindet an das Biotin. Beim Auseinanderziehen von Stempel und Objektträger baut sich eine Kraft über das gesamte Konstrukt auf und die schwächste Bindung öffnet zuerst. Die zeitliche Veränderung der anliegenden äußeren Kraft wird dabei, wie auch im AFM-Experiment, entscheidend von Polymerspacern bestimmt, mit denen die Oberflächen zu Beginn beschichtet wurden (siehe Anhang B). Entsprechend des Bindungspotentials der DNA-Duplexe verbleibt der Fluoreszenzmarker auf Stempel oder Slide und wird mit einem Fluoreszenzscanner ausgelesen.

2.3.2 Auswertung und Korrektur der Fluoreszenzaufnahmen

Nachdem Stempel und Objektträger unter physiologischem Puffer in Kontakt waren und wieder separiert wurden, wird jedes einzelne Quadrat der Mikrostruktur ausgewertet. Ziel ist es, für die zu vergleichenden DNA-Probenduplexe und -Referenzduplexe eine Überlebenswahrscheinlichkeit Φ_S und Φ_R anzugeben. Dabei gilt natürlich $\Phi_R = 1 - \Phi_S$. Dazu wird die Fluoreszenzintensität (des Cy3-Fluorophors) $Cy3_{REM}$ der Kontaktfläche mittels Laserscanner gemessen (siehe Abbildung 2.14). Zwischen den Kontaktflächen wird die ursprüngliche Fluoreszenzdichte $Cy3_{START}$ gemessen. Wäre die Kopplungsintensität 100 %, d.h. hätten alle Waagen an den Stempel gebunden, so wäre die Überlebenswahrscheinlich-

³Polydimethylsiloxan

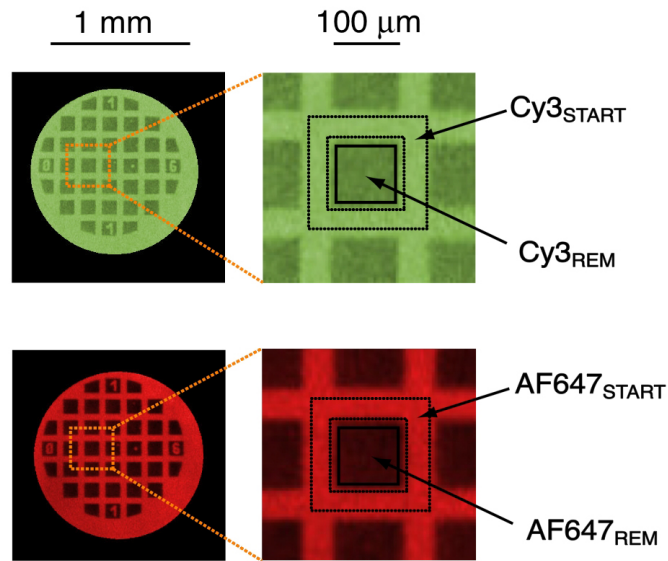


Abbildung 2.14: Auswertung des Fluoreszenzsignals von Cy3 und AlexaFluor zur Bestimmung der korrigierten Überlebenswahrscheinlichkeit Φ_S des Probenduplexes.

keit des Probenduplexes

$$\Phi_S = \frac{Cy3_{REM}}{Cy3_{START}}. \quad (2.13)$$

Da jedoch nicht alle Biotin-funktionalisierten Waagen an das Straptavidin des Stempels gekoppelt haben, wird die Kopplungseffizienz ermittelt. Dazu wird auf den Objektträger AlexaFluor-markiertes Avidin gegeben. Dieses bindet an das freie Biotin und emittiert bei einer anderen Wellenlänge als Cy3 (Abbildung 2.14). Die Kopplungseffizienz beträgt

$$E = \frac{AF647_{REM}}{AF647_{START}}. \quad (2.14)$$

Damit kann der Cy3-Offset zu

$$Cy3_{Offset} = Cy3_{START} \cdot \frac{AF647_{REM}}{AF647_{START}} \quad (2.15)$$

berechnet werden. Die korrigierte Überlebenswahrscheinlichkeit Φ_S für den Probenduplex beträgt damit

$$\Phi_S = \frac{Cy3_{REM} - Cy3_{Offset}}{Cy3_{START} - Cy3_{Offset}}. \quad (2.16)$$

2.3.3 Dynamische Messung mit der molekularen Kraftwaage

Aufgrund der großen Anzahl von Bindungen pro Kontaktfläche ($\sim 10^9$) baut sich beim Separationsprozess eine große Spannung auf. Dies führt dazu, dass sich der Silikonstempel elastisch verformt und sich die Noppen keilförmig vom Objektträger ablösen. Darüber hinaus stellt man fest, dass bei höheren Piezogeswindigkeiten ($> 50 \text{ nm/s}$) der Ablösevorgang nicht mehr mit gleichförmiger Geschwindigkeit geschieht. Vielmehr lösen sich die Noppen zu Beginn an den Rändern langsam ab und dort wo der Kontakt am längsten besteht bauen sich höhere Geschwindigkeiten auf. Dementsprechend werden die Bindungen mit unterschiedlichen Kraftladungsraten belastet [50]. Es wurde nun ein Verfahren entwickelt, um die Ablösegeschwindigkeiten mittels RICH (Reflection Interference Contrast Microscopy) quantitativ zu erfassen [51]. Dazu wurde der Aufbau auf ein Inversmikroskop montiert und der Ablösevorgang beleuchtet und mittels CCD-Kamera gefilmt. Aufgrund des keilförmigen Ablösevorgangs und der unterschiedlichen Brechungsindizes von Glas-Objektträger, Pufferlösung und Silikonstempel kommt es zu Interferenzringen die sich lateral bewegen und deren Geschwindigkeit direkt proportional zur vertikalen Ablösegeschwindigkeit ist (siehe Abbildung 2.15) [52, 53]. Die ersten beiden Interferenzmaxima wurden mit einer Gauß-Kurve gefittet sowie ihre Scheitelposition bestimmt. Aus Position und Zeit (Kamerabilder) wurde ihre laterale Geschwindigkeit v_L bestimmt. Mittels eines Konvertierungsfaktors k wurde die vertikale Ablösegeschwindigkeit berechnet:

$$v_z = k \cdot v_L = \frac{h_2 - h_1}{L_2 - L_1} \cdot v_L. \quad (2.17)$$

Dabei sind L_1 , L_2 , $h_1 = 124 \pm 3 \text{ nm}$, $h_2 = 362 \pm 5 \text{ nm}$ Abstand und Höhe an den jeweiligen Interferenzmaxima (Abbildung 2.15) [52]. Am Ende des Ablösevorgangs geschieht dieser jedoch so schnell, dass die Bildrate der Kamera nicht ausreicht, um die Bewegung der Interferenzringe aufzulösen. Deshalb wurde dieser Teil im Geschwindigkeitsprofil linear interpoliert (siehe Kapitel 6). Die DNA-Duplexe wurden auf Polyethylenglycol (PEG) beschichteten Oberflächen angebunden (Kapitel 3). Die an der DNA anliegende Kraftladungsraten hängt deshalb hauptsächlich von diesem Polymerspacer ab. Da dieser schon im Einzelmolekülexperiment exakt charakterisiert wurde, ist es möglich, das Geschwindigkeitsprofil in Kraftladungsraten und zugehörige Kräfte umzurechnen. Da die verwendeten PEG-Linker die Elastizität im System dominieren, wurde eine Standard-Kraft-Abstandskurve eines PEG Polymers bestehend aus 68 Monomeren mit einem Freely Jointed Chain (FJC) Modell simuliert. Zusammen mit den bereits bekannten Potentialbreiten Δx und natürlichen Dissoziationsraten k_{off} der verwendeten DNA-Oligomere (Oligonukleotide) läßt sich die Verteilung der wahrscheinlichsten Abrisskraft $p(F)$ und der zugehörigen Kraftladungsraten mit Gleichung 4.24 für jede Geschwindigkeit bestimmen [54, 55]. Man hat nun die Möglichkeit jedem Fluoreszenzwert und damit der Überlebenswahrscheinlichkeit Φ_S eine Kraftladungsraten zuzuordnen (siehe Kapitel 6).

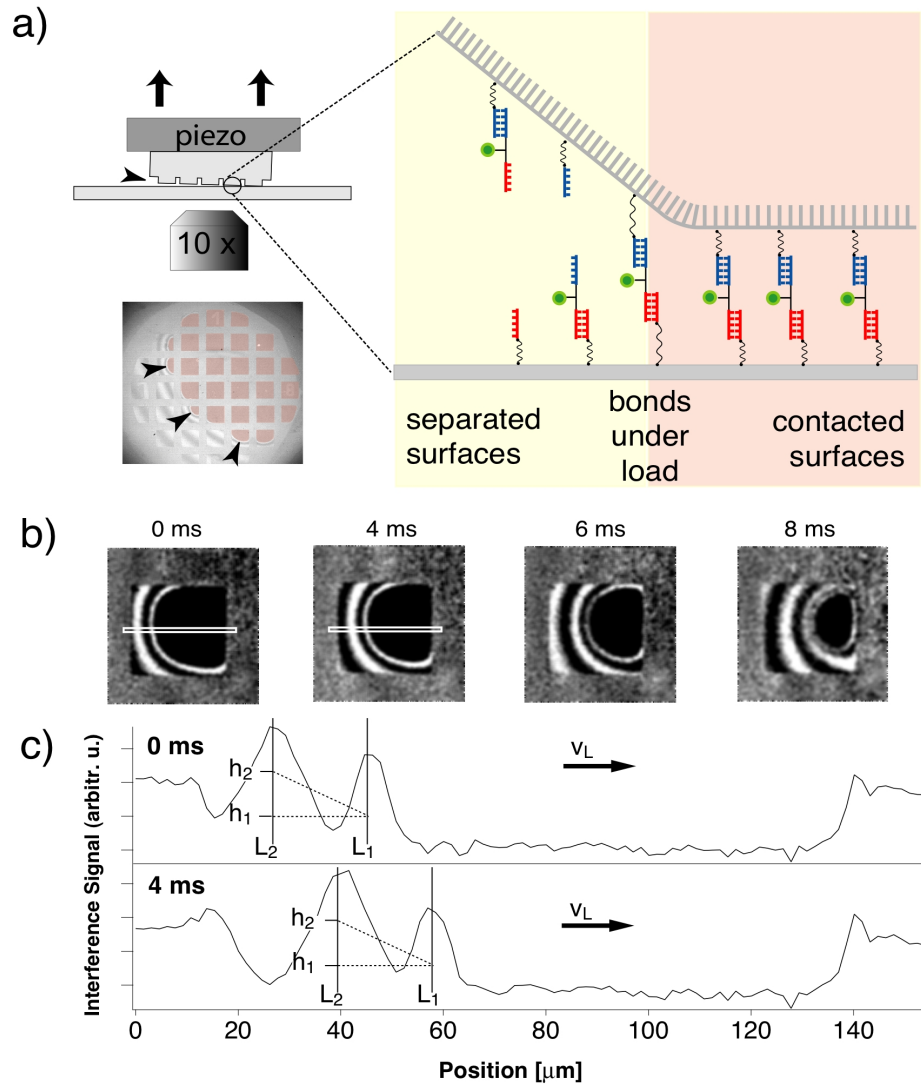


Abbildung 2.15: Dynamische Messungen mit der molekularen Kraftwaage basierend auf RICM. a) Der Silikonstempel wird nach oben bewegt und löst sich keilförmig ab. b) Die entstehenden Interferenzringe werden aufgezeichnet und ihre zeitlich veränderliche Position ausgewertet. c) Die Lateralschwindigkeit wird in die tatsächliche Ablösegeschwindigkeit v_z umgerechnet.

Kapitel 3

Oberflächenfunktionalisierung und DNA-Anbindung

Sowohl im AFM-Experiment als auch bei den Versuchen mit der molekularen Kraftwaage (MFB) werden die Oligo-DNA Moleküle (oder auch Antikörper, Peptide, etc.) nicht direkt an die Oberflächen gebunden. Die Oberflächen werden zunächst mit Polymeren wie zum Beispiel Polyethylenglykol (PEG) beschichtet. Diese werden in so hoher Dichte aufgebracht, dass sie senkrecht von der Oberfläche abstehen und eine büstenartige Struktur bilden. An diese Polymere werden dann über reaktive Gruppen die zu untersuchenden Moleküle angebunden. Dieses Verfahren bietet die Möglichkeit bei immer gleich definierten Rahmenbedingungen an unterschiedlichen Molekülen zu experimentieren. Darüberhinaus reduziert diese Polymerbeschichtung unerwünschte Wechselwirkungen beim Kontakt zweier Oberflächen nahezu auf null, wenn beide Oberflächen diese PEG-Beschichtung tragen (Oberflächenpassivierung von Cantilever und Objektträger). Außerdem kann über diese Polymere die Elastizität des Systems eingestellt werden und dementsprechend der Kraftübertrag auf das Probenmolekül beeinflusst werden [56, 57]. Der Polymerspacer vermindert zudem das Einkoppeln der Cantileverschwingung in die Molekülbindung.

Die Polymerbeschichtung von Oberflächen sowie eine effiziente DNA-Anbindung wurde in zahlreichen Testreihen untersucht. Ziel war es ein Standardprotokoll zu finden, das obige Eigenschaften reproduzierbar gewährleistet und sowohl für AFM- als auch für MFB-Experimente anwendbar ist. Dies ermöglicht auch den direkten Vergleich beider Verfahren.

Parameter, die in den Testreihen variiert wurden, sind:

- Die Länge des PEG-Spacers und dessen funktionale Endgruppen. Dabei bedeutet die Variation der reaktiven Endgruppen natürlich eine grundlegende Änderung der gesamten anzuwendenden chemischen Verfahren.
- Die Art, Konzentration und pH-Werte unterschiedlicher Pufferlösungen.
- Konzentrationen der einzelnen Komponenten wie PEG, DNA-Oligomere sowie chemischer Substanzen zur Aktivierung und Funktionalisierung.

- Allgemeine chemische und physikalische Behandlungen der Flächen (Aktivierung, Trocknung, Temperatur, Dauer).

Im Folgenden ist die Methode dargestellt, die sich am effizientesten erwiesen hat, eine stabile, homogene Oberfläche mit einer dichten Anbindung von PEG und DNA-Molekülen zu ermöglichen. Dabei sind die einzelnen Schritte im Detail in den jeweiligen Kapiteln des Anhangs dieser Arbeit aufgeführt.

- Zu Beginn wird ein *Di-NH₂-PEG* (Di-Amino-PEG, MW 3000 g/mol) auf einen Epoxy-silanisierten Objektträger aufgeschmolzen (Protokoll B.2).
- Die freien *NH₂*-Enden des PEG werden zu Carboxygruppen (COOH) umfunktionalisiert (Protokoll B.2).
- Das Slide wird mit *H₂O* gewaschen und in BORAT Puffer deprotoniert (geblockt, 1h). Anschließend wird es wieder mit *H₂O* gewaschen und mit *N₂* getrocknet.
- Es erfolgt eine Voraktivierung mit EDC/NHS (Protokoll B.3).
- DNA-Oligo A ist an einem Ende mit einer Hydrazid-Gruppe versehen und wird darüber auf das Slide (*COOH-PEG*) angebunden (Protokoll B.3).
- DNA-Oligo B ist zu DNA-Oligo A komplementär und wird an diesen hybridisiert. Es trägt einen Cy3-Fluoreszenzmarker und dient so zur Analyse von Dichte und Homogenität der DNA-Anbindung. Dazu wird ein Bild im Laserscanner (Tecan LS 300) aufgenommen (Protokoll B.3).

Für das AFM-Experiment wird ein DNA-Oligo auf dem Objektträger angebunden und der dazu komplementäre DNA-Oligo auf den Cantilever. Sie hybridisieren bei jedem Kontakt nahe der Oberfläche. Es können so die Kraft-Abstandskurven aufgenommen werden. Für das MFB-Experiment wird ein dritter DNA-Oligo C benötigt. Er ist Biotin-funktionalisiert und bindet bei Kontakt an den mit Streptavidin beschichteten PDMS-Stempel [48, 49, 58, 59]. In Abbildung 3.1 ist ein Fluoreszenzbild als Test der DNA-Anbindung zu sehen. Es wurde mittels Laserscanner aufgenommen und zeigt die Verteilung der DNA innerhalb zweier Felder auf dem Objektträger. In Abbildung 3.2 ist die Fluoreszenzintensität mehrerer Felder aufgetragen. Die variierten Parameter sind die Konzentration der Oligoanbindung auf das PEG (Rezeptoroligo), EDC Zugabe bei Oligoanbindung (+/– EDC) und die EDC/NHS Voraktivierung (blau, violett: voraktiviert; hellrosa, hellgrün: nicht voraktiviert). Das höchste Signal (Cy3-Intensität 40315 [bel.]) und damit die größte Anbindungsichte erreicht man bei einer Oligo-Konzentration von 50 μ M und EDC/NHS Voraktivierung (blau, violett). Außerdem wirkt sich eine zusätzlichen EDC Zugabe in den MES-Anbindungspuffer positiv aus. Das Signal-to-Noise-Ratio beträgt $SNR = 123$ bei einer Standardabweichung von $\sigma = 7\%$. Die Anbindung von Hydrazid-funktionalisierten DNA-Oligomeren an Carboxy-PEG funktioniert besser als die Anbindung von Amino-funktionalisierten DNA-Oligomeren. Dies liegt an der ähnlicheren Säurestärke (pK_S -Wert) von Hydrazid- und Carboxygruppe.

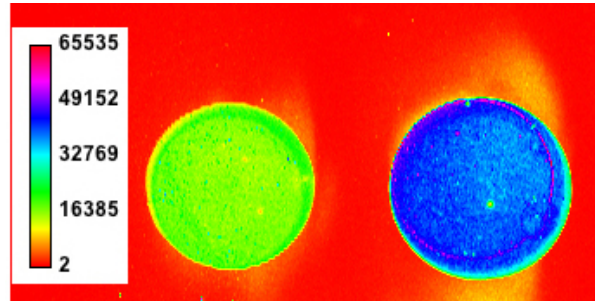


Abbildung 3.1: Anbindungstest oligomerer DNA auf PEG. Zum Nachweis wird komplementäre fluoreszenzmarkierte DNA hybridisiert.

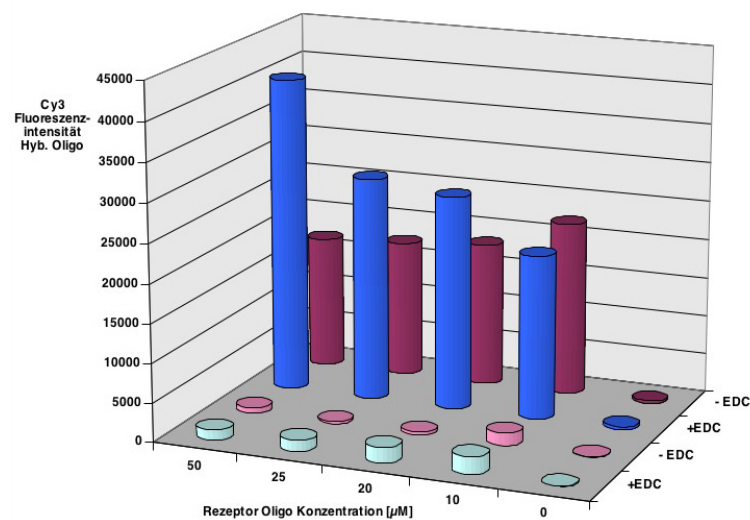


Abbildung 3.2: Anbindungstest von DNA-Oligomeren (30bp). Ein Rezeptoroligo (A) wurde auf PEG angebunden. Dieser wurde mittels fluoreszenzmarkierter Cy3-DNA (B) nachgewiesen (Hybridisierung). Das beste Ergebnis wird bei hoher Oligokonzentration, EDC/NHS Voraktivierung (blau, violett) und EDC-Zugabe bei Anbindung erreicht.

Kapitel 4

Die molekulare Bindung

Die nicht-kovalente molekulare Bindung zwischen Rezeptor (R) und Ligand (L) kann als Zwei-Zustands-Modell beschrieben werden, in dem die Bindungspartner getrennt oder als Komplex vorliegen ([58]):



Der gebundene Zustand unterscheidet sich vom ungebundenen durch die Differenz der freien Gibbsschen Energie ΔG . Die Wahrscheinlichkeit freie Moleküle oder Rezeptor-Ligand-Komplexe zu finden hängt von der Assoziationsrate k_{on} und der Dissoziationsrate k_{off} ab [60]:

$$\frac{d[RL]}{dt} = -k_{off}[RL] + k_{on}[R][L] \quad (4.2)$$

$$\frac{d[R]}{dt} = k_{off}[RL] - k_{on}[R][L] \quad (4.3)$$

$$\frac{d[L]}{dt} = k_{off}[RL] - k_{on}[R][L] \quad (4.4)$$

Im Gleichgewicht gilt

$$\frac{d[R]}{dt} = \frac{d[L]}{dt} = 0 \quad (4.5)$$

und die Gleichgewichtskonstante der Dissoziation K_D ist

$$K_D = \frac{[R][L]}{[RL]} = \frac{k_{off}}{k_{on}}. \quad (4.6)$$

Da Dissoziation und Assoziation thermisch angeregt sind und es sich um eine Boltzmann-verteilung handelt, kann man mit Hilfe des Van't-Hoff-Arrhenius-Gesetzes schreiben [56]:

$$k_{on} = \nu_{on} \cdot e^{\frac{-\Delta G_{on}}{k_B T}} \quad (4.7)$$

$$k_{off} = \nu_{off} \cdot e^{\frac{-\Delta G_{off}}{k_B T}} \quad (4.8)$$

Dabei ist k_B die Boltzmannkonstante und T die absolute Temperatur. ν_{on} und ν_{off} sind die Probierraten der Moleküle zu assoziieren oder dissoziieren. Nimmt man nun an, dass $\nu_{on} \approx \nu_{off}$, so gilt mit

$$\Delta G = \Delta G_{off} - \Delta G_{on}, \quad (4.9)$$

dass

$$K_D = e^{\frac{-\Delta G}{k_B T}}. \quad (4.10)$$

Die freie Gibbssche Energie ΔG setzt sich aus enthalpischen und entropischen Beiträgen zusammen:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S = -k_B T \cdot \ln K_D. \quad (4.11)$$

Mit Hilfe kraftspektroskopischer Messungen können intramolekulare Kräfte (Entfaltung) sowie intermolakulare Wechselwirkungen (Rezeptor-Ligand-Interaktion) erforscht werden. Die Kraft-Abstandskurven, welche mit einem Rasterkraftmikroskop (AFM) aufgenommen werden, ermöglichen es die Potentiallandschaft der molekularen Bindung zu charakterisieren [60, 61, 62, 63]. Legt man eine äußere Kraft F an die Rezeptor-Ligand Bindung an, so entspricht das einer Erniedrigung der Potentialbarriere ΔG_{off} um den Betrag $F \cdot \Delta x$, wobei Δx der Potentialbreite entspricht. Die Wahrscheinlichkeit die Potentialbarriere zu überwinden erhöht sich folglich. Um die kraftabhängige Dissoziationsrate $\lambda(F)$ welche dem Kehrwert der Lebensdauer entspricht zu bestimmen, geht man wieder von dem Van't-Hoff-Arrhenius Gesetz aus [56, 55, 60]:

$$\lambda(t) = k_{off} = \nu \cdot e^{\frac{-\Delta G_{off}}{k_B T}} \quad (4.12)$$

Für die zeitliche Änderung der Anzahl der gebundenen Rezeptor-Ligand Systeme N_B gilt

$$\frac{dN_B}{dt} = -\lambda(t) \cdot N_B. \quad (4.13)$$

Man erhält die zur Zeit t gebundenen Rezeptor-Ligand Systeme durch Integration:

$$N_B(t) = e^{-\int_0^t dt' \lambda(t')}. \quad (4.14)$$

Es lässt sich die Anzahl der dissoziierten Komplexe bestimmen.

$$N_D(t) = 1 - N_B(t) = 1 - e^{-\int_0^t dt' \lambda(t')} \quad (4.15)$$

Da angenommen werden kann, dass die Kraft eine stetige umkehrbare Funktion der Zeit ist, lässt sich die Zeit t durch die Kraft F ersetzen.

$$N_D(t) = 1 - e^{-\int_0^F df \lambda(f) \cdot \frac{1}{f}} \quad \text{mit} \quad \dot{f} = \frac{df}{dt} \quad (4.16)$$

Die Wahrscheinlichkeit der Dissoziation der molekularen Bindung berechnet sich damit als

$$p(F) = \frac{dN_D}{dF}(F) = \lambda(F) \cdot \frac{1}{F} \cdot e^{-\int_0^F df \lambda(f) \cdot \frac{1}{f}} \quad (4.17)$$

Dabei wird $\dot{F} = \frac{dF}{dt}$ als Kraftladungsrate bezeichnet. Nach Kramers kann die Bewegung eines Liganden bei stark gedämpften Prozessen mit einer Langevin-Gleichung beschrieben werden:

$$M \cdot \ddot{x} = -\frac{dU(x)}{dx} - \gamma \cdot M \cdot \dot{x} + \xi(t) \quad (4.18)$$

Dabei bezeichnet M die Masse des Liganden, x den Abstand zwischen Rezeptor und Ligand, $U(x)$ das Potential, γ die Reibungskonstante und $\xi(t)$ eine fluktuierende Kraft entsprechend dem thermischen Rauschen. Legt man eine externe Kraft F an, so gilt im Gleichgewicht:

$$-\frac{dU(x)}{dx} = F \quad (4.19)$$

Um die Bindung zu verlassen, muss ein Bindungspartner die Strecke Δx überwinden (siehe Abbildung 4.1). Aus Gleichung 4.18 erhält man bei kleinen Kräften im Vergleich zum

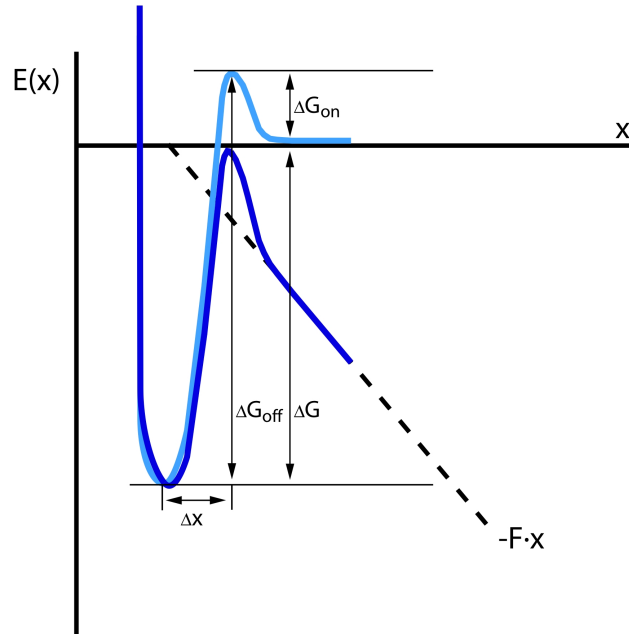


Abbildung 4.1: Potential $E(x)$ einer molekularen Bindung (hellblau). Durch anlegen einer äußeren Kraft F reduziert sich die Potentiallandschaft zu $E(x) - F \cdot x$ (dunkelblau).

Potential für die dafür benötigte Zeit τ

$$\tau = \frac{2\pi \cdot \gamma}{\omega_{min} \cdot \omega_{max}} \cdot e^{\frac{\Delta G_{off} - F \cdot \Delta x}{k_B T}} \quad (4.20)$$

ω_{min} und ω_{max} bezeichnen die Wurzeln der Krümmung des Potentials $\Delta G_{off} - F \cdot \Delta x$ am Minimum und Maximum. Nimmt man an, dass ω_{min} und ω_{max} unabhängig von der Kraft F sind so erhält man mit $\lambda(F) = \frac{1}{\tau}$ die Kramers Relation:

$$\lambda(F) = \frac{\omega_{min} \cdot \omega_{max}}{2\pi \cdot \gamma} \cdot e^{-\frac{\Delta G_{off} - F \cdot \Delta x}{k_B T}} \quad (4.21)$$

Für eine Kraft $F = 0$ erhält man die natürliche Dissoziationsrate:

$$\lambda(F = 0) = k_{off} = \frac{\omega_{min} \cdot \omega_{max}}{2\pi \cdot \gamma} \cdot e^{-\frac{\Delta G_{off}}{k_B T}} \quad (4.22)$$

Daraus folgt

$$\lambda(F) = k_{off} \cdot e^{\frac{F \cdot \Delta x}{k_B T}} \quad (4.23)$$

Setzt man Gleichung 4.23 in Gleichung 4.17 ein, so erhält man für die Wahrscheinlichkeit der Dissoziation

$$p(F) = k_{off} \cdot e^{\frac{F \cdot \Delta x}{k_B T}} \cdot \frac{1}{\dot{F}} \cdot e^{-k_{off} \int_0^F e^{\frac{f \cdot \Delta x}{k_B T}} \cdot \frac{1}{f} df} \quad (4.24)$$

Das Maximum der Wahrscheinlichkeitsverteilung und damit die wahrscheinlichste Abrisskraft F_{max} erhält man durch Nullsetzen der Ableitung

$$\frac{d}{dF} p(F) = 0 \quad (4.25)$$

Nimmt man die Kraftladungsrate \dot{F} als unabhängig von der Kraft F an, so gilt für die wahrscheinlichste Abrisskraft F_{max}

$$F_{max}(\dot{F}) = \frac{k_B T}{\Delta x} \cdot \ln \left(\frac{\dot{F}}{k_{off}} \cdot \frac{\Delta x}{k_B T} \right) \quad (4.26)$$

Somit hat man die Möglichkeit aus den Gleichungen 4.24 und 4.26 jeweils die Potentialbreite Δx und die natürliche Dissoziationsrate k_{off} für eine Verteilung aus Abrisskräften und Kraftladungsraten zu bestimmen.

Kapitel 5

Einzelmolekülexperimente an DNA-Oligomeren

5.1 Bindungskräfte kurzer DNA

Aufgrund der Ergebnisse von Experimenten der molekularen Kraftwaage (MFB) an kurzen DNA-Oligomeren (siehe Kapitel 6), wurden analoge Versuche im Rasterkraftmikroskop (AFM) durchgeführt. Dazu wird ein Glasobjektträger mit PEG-Polymeren beschichtet und darauf DNA-Moleküle mit einer Länge von 30 Basenpaaren angebunden (Kapitel 3). Das dazu komplementäre DNA-Oligomer wird in der gleichen Prozedur an den beschichteten AFM-Cantilever angebunden. Bringt man im Experiment beide Oberflächen in Kontakt, so hybridisieren die DNA-Oligomere zu einem Doppelstrang. Durch Auseinanderziehen wird eine Kraft auf diese molekulare Bindung übertragen und führt schließlich zu ihrer Dissoziation. Die wahrscheinlichste Kraft, bei der sich der Rezeptor-Ligand-Komplex öffnet, hängt dabei von Zuggeschwindigkeit und Dehnungsverhalten des Polymerspacers ab. Der Vorgang wird mehrere Hundert oder Tausend Male wiederholt, wobei idealerweise die Dichte der DNA-Moleküle auf den Oberflächen so eingestellt ist, dass nur eine Bindung pro Kontakt zustande kommt. Abbildung 5.1 zeigt das Ergebnis einer solchen Messung bei einer bestimmten Geschwindigkeit. Man erhält eine Verteilung der Dissoziationskräfte (Abbildung 5.1a), der zugehörigen Kraftladungsraten (Abbildung 5.1b) und der gemessenen Abrisslängen (Abbildung 5.1c). Diese Ergebnisse eines AFM-Experimentes können nun herangezogen werden, um das Bindungspotential der Basenpaarwechselwirkungen der 30bp DNA zu bestimmen. Dazu wird entsprechend Gleichung 4.24 die Wahrscheinlichkeitsdichte $p(F)$ an die Verteilung der gemessenen Dissoziationskräfte und Kraftladungsraten angefitet (blaue Kurven in Abbildung 5.1a,b) [64, 55]. Durch die Berechnung eines Freely-Jointed-Chain Modells für das verwendete PEG-Polymer kann jeder Abrisskraft F eine Kraftladungsrate \dot{F} zugeordnet werden. Es werden die Potentialbreite Δx und die natürliche Dissoziationsrate k_{off} als Fitparameter variiert. Da im Experiment die Abriss- bzw. Polymerlängen variieren, wird nach ihrer Verteilung gemäß Abbildung 5.1c gewichtet und anschließend normiert.

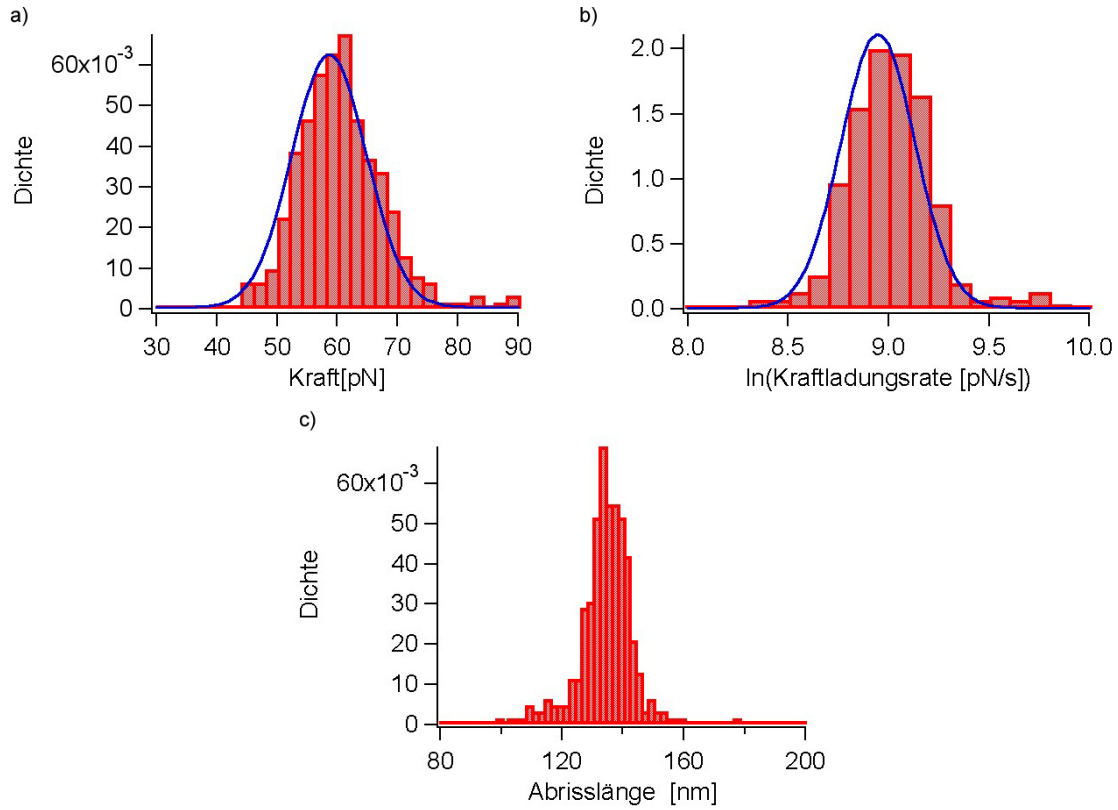


Abbildung 5.1: Normierte Histogramme: a) Verteilung der gemessenen Dissoziationskräfte. b) Verteilung der Kraftladungsrate. c) Gemessene Abrisslängen. Blaue Kurven: Fit der Wahrscheinlichkeitsdichte $p(F)$ zur Bestimmung der Potentialbreite Δx und der natürlichen Dissoziationsrate k_{off} .

Eine zweite Methode, AFM-Experimente auszuwerten und das Potential der molekularen Bindung zu bestimmen hat man, wenn man mehrere Experimente bei jeweils unterschiedlichen Geschwindigkeiten durchführt [64, 55]. Man trägt dann die Maxima der gemessenen Abrisskräfte F_{max} gegen den natürlichen Logarithmus der Kraftladungsrate $\ln(\dot{F})$ auf. Diese Werte werden linear gefittet. Nach Gleichung 4.26 erhält man die gesuchten Werte für die Potentialbreite Δx und die natürliche Dissoziationsrate k_{off} :

$$\Delta x = \frac{k_B T}{m} \quad (5.1)$$

$$k_{off} = \frac{\dot{F}(F_{max} = 0) \cdot \Delta x}{k_B T} \quad (5.2)$$

Dabei ist m die Steigung der an die Messwerte gefitteten Geraden.

Im dynamischen MFB-Experiment wurde festgestellt, dass bei hohen Zuggeschwindigkeiten ein Unterschied in der Stabilität der DNA-Bindung besteht, je nachdem ob der

hybridisierte Doppelstrang an seinen 3'-Enden oder 5'-Enden in Schergeometrie belastet wird. Es erwies sich der Strang, der an seinen 3'-Enden immobilisiert war als stabiler. Um zu untersuchen, ob auch im Einzelmolekülexperiment ein Unterschied zwischen den Zugrichtungen feststellbar ist, wurden 30bp Oligomere in verschiedenen Messreihen in 3'-3' Richtung oder 5'-5' Richtung belastet¹. Abbildung 5.2 zeigt die wahrscheinlichsten Dissoziationskräfte F_{max} aufgetragen gegen den Logarithmus der zugehörigen Kraftladungsrate \dot{F} . Die Werte entsprechen dabei, wie oben beschrieben, den Maxima der gemessenen Ver-

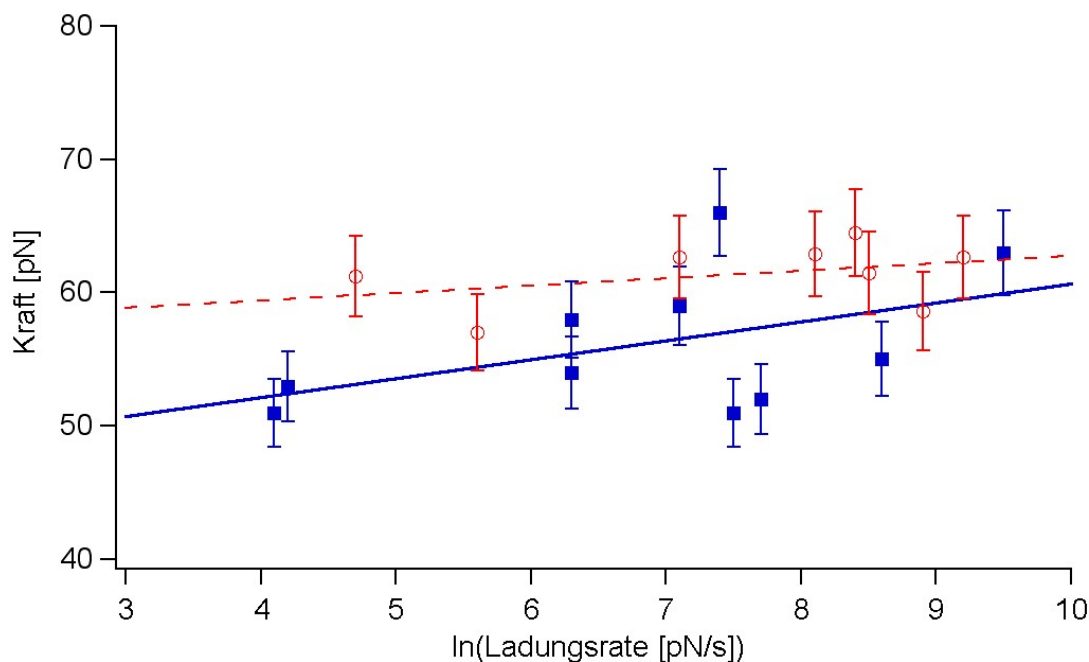


Abbildung 5.2: Wahrscheinlichste Dissoziationskraft F_{max} gegen Logarithmus der Kraftladungsrate \dot{F} aufgetragen. Belastung an 3'-Enden: blaue Datenpunkte ■ mit Fit-Gerade (—). Belastung an 5'-Enden: rote Datenpunkte ○ mit Fit-Gerade (---).

teilungen eines Einzelexperiments bei einer bestimmten Geschwindigkeit wie in Abbildung 5.1a,b gezeigt. Die Geschwindigkeit welche an den AFM-Cantilever angelegt wurde reichte dabei von 50 nm/s bis 5000 nm/s was Kraftladungsraten von 60 pN/s bis $1,35 \cdot 10^4 \text{ pN/s}$ bei einem verwendeten PEG-Spacer mit Molekulargewicht $MW = 6000 \text{ g/mol}$ entspricht. Das Spektrum der möglichen Geschwindigkeiten ist dabei einerseits durch die Cantileverdrift und andererseits durch die Rate der Datenerfassung limitiert. Das relativ lange PEG-Polymer wurde gewählt um einen Übertrag von Schwingungen auf die DNA-Bindung zu verhindern [57]. In Abbildung 5.2 sind die Abrisskräfte der 30bp DNA aufgetragen beim Ziehen an ihren 3'-Enden (blauen Datenpunkte ■) sowie an ihren 5'-Enden (rote Datenpunkte ○). Die Messreihen wurden jeweils mit einer Geradenfunktion gefittet. Die

¹Dies wird gesteuert durch die Funktionalisierung der DNA mit reaktiven Endgruppen bei der Herstellung. Darüber erfolgt die Anbindung an Cantilever und Slide (siehe Kapitel B.3).

Ergebnisse der MFB Messungen konnten im AFM nicht bestätigt werden. Es scheint im Gegenteil so, dass die DNA bei 5'-5'-Belastung bei den hier gezeigten Ladungsraten geringfügig stabiler ist. Die linearen Fits ergeben für die 3'-3'-Belastung (blaue Linie —) eine Potentialbreite $\Delta x = 2,9 \text{ nm}$ und eine natürliche Dissoziationsrate $k_{off} = 4,4 \cdot 10^{-15} \text{ s}^{-1}$. Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen von Strunz et al. im Rahmen der dort angegebenen Schwankungsbreite gut überein [54]. In dieser Arbeit wurden für Δx und k_{off} folgende Abhängigkeiten von der Anzahl der Basenpaare n gefunden:

$$\Delta x = (7 \pm 3) \text{ \AA} + (0,7 \pm 0,3) \cdot n \text{ \AA} \quad (5.3)$$

$$k_{off} = 10^{\alpha - \beta n} \text{ s}^{-1} \quad (5.4)$$

mit $\alpha = 3 \pm 1$ und $\beta = 0,5 \pm 0,1$. Diese Werte beziehen sich zwar auf Experimente bei denen die hybridisierten DNA-Oligomere in 5'-5'-Richtung getrennt wurden, trotzdem sind sie als Vergleich für die hier durchgeführten Messungen heranzuziehen. Die in Abbildung 5.2 dargestellten Datenpunkte für die 5'-5'-Belastung erlauben keine eindeutige Unterscheidung von den 3'-3'-Messungen. Führt man einen linearen Fit an die Punkte der 5'-5'-Messungen durch (rote gestrichelte Linie ---), so erhält man wegen der geringen Steigung der Geraden ein $\Delta x = 6,9 \text{ nm}$ und $k_{off} = 1,0 \cdot 10^{-41} \text{ s}^{-1}$. Trotz dieser fragwürdigen Werte scheint der flache Verlauf der 5'-5'-Regressionsgeraden in sofern sinnvoll, da bei höheren Ladungsraten folglich ein Schnittpunkt mit der 3'-3'-Regressionsgeraden existiert. Ab diesem Punkt übersteigt die absolute Dissoziationskraft der 3'-3'-Belastung die der 5'-5'-Belastung. Die Ergebnisse der MFB-Messungen sind in Kapitel 6.1 dargestellt. Eine vergleichende Diskussion der AFM- und MFB-Messungen schließt daran an (Kapitel 6.2).

5.2 BS-Übergänge bei kurzen DNA-Oligomeren

Neben den Trennkräften des doppelsträngigen DNA-Moleküls war auch das Dehnungsverhalten in zahlreichen Studien von Interesse [65, 66, 45]. Diese wurden jedoch zumeist an λ -Phagen-DNA mit einer Länge von mehreren tausend Basenpaaren durchgeführt. Die λ -DNA zeigt beim Anlegen einer äußeren Kraft ein sogenanntes BS-Plateau in der Kraft-Abstandskurve der AFM-Messung. Das BS-Plateau zeigt den Übergang von der ursprünglichen B-Konformation zur überstreckten S-Konformation der DNA. Es liegt unter physiologischen Bedingungen bei 65 pN und hat eine Länge die der Streckung der DNA um das 1,7-fache seiner ursprünglichen Konturlänge entspricht (siehe auch Kapitel 7).

Es wurde nun untersucht, ob auch kurze DNA Oligomere solch ein BS-Plateau zeigen, wenn sie nach der Hybridisierung ihrer Einzelstränge im AFM in Schergeometrie auseinandergezogen werden [67]. Dazu wurden die aufgenommenen Kraft-Abstandskurven (Kapitel 5.1) danach ausgewertet, ob sie vor ihrem Abriss ein solches BS-Plateau zeigen. Abbildung 5.3a zeigt eine typische Kraft-Abstandskurve einer 30 Basenpaar DNA-Bindung ohne ein sichtbares BS-Plateau. Der Kurvenverlauf spiegelt die elastische Dehnung des PEG-Spacer Moleküls wieder und kann mit einem FJC-Modell gefittet werden (schwarze Linie). In 10 %

bis 30 % aller Kurven lässt sich ein BS-Plateau wie in Abbildung 5.3b und c erkennen. Die Kraft-Abstandskurven zeigen einen horizontalen Verlauf vor dem Öffnen der Basenpaarbindungen. Dabei wurde einmal die DNA an ihren 5'-Enden (5.3b) und einmal an ihren 3'-Enden (5.3c) belastet. Die Länge der hier gezeigten Plateaus beträgt $4,8\text{ nm}$ und $6,1\text{ nm}$. Bei doppelsträngiger B-DNA beträgt die Länge pro Basenpaar $l = 0,34\text{ nm}$. Bei 30bp DNA wäre nach 1,7-facher Streckung also maximal ein Plateau mit einer Länge von $l = 7,14\text{ nm}$ zu erwarten. Die Zeit, während der die DNA-Bindung belastet wird, ist proportional zur Plateaulänge. Ein Öffnen während der Plateaustreckung ist somit wahrscheinlich. Dementsprechend sind die gemessenen Plateaulängen meist niedriger als die maximal Mögliche. Abbildungen 5.3b und c zeigen ebenfalls einen FJC-Fit im Bereich ansteigender Kraft der aufgenommenen Kurven (gestrichelte Linien). Man sieht, dass bei Auftreten eines BS-Plateaus der Kurvenverlauf nicht bis direkt zum Abriss dem FJC-Verlauf entspricht. Deshalb kann es auch zu Abweichungen bei der Bestimmung der Kraftladungsrate aus dem FJC-Modell kommen. Bei DNA-Oligomeren mit einer Länge von 20 Basenpaaren (20bp) konnten im Gegensatz zu den hier gezeigten 30bp DNA-Duplexen keine BS-Plateaus gefunden werden [67].

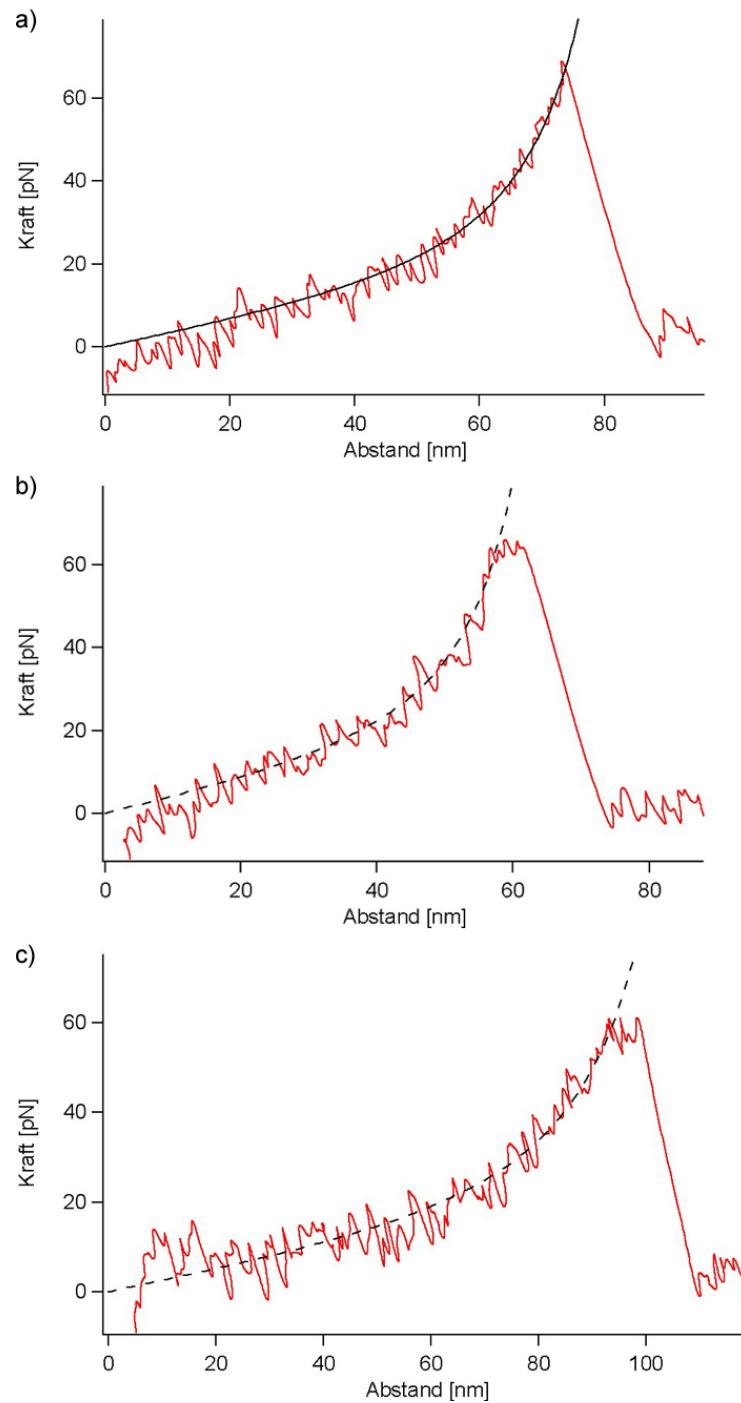


Abbildung 5.3: Kraft-Abstandskurven von 30bp DNA und Belastung in Schergeometrie. a) Belastung des DNA-Duplexes in 5'-5'-Richtung. Die Kurve zeigt kein BS-Plateau. b) Belastung des DNA-Duplexes in 5'-5'-Richtung mit BS-Plateau der Länge 4,8 nm. c) Belastung des DNA-Duplexes in 3'-3'-Richtung. Das Plateau ist 6,1 nm lang.

Kapitel 6

Ensembleexperimente an DNA-Oligomeren

6.1 Der kinetische Effekt

Mittels der molekularen Kraftwaage (MFB) wurde das Trennverhalten von kurzen DNA-Duplexen analog zu den oben beschriebenen AFM-Experimenten (Kapitel 5) untersucht. Es werden dazu zwei DNA-Duplexe, ein Probeduplex und ein Referenzduplex, im Ensemble nach ihrer Bindungsstärke verglichen. Ein Fluoreszenzmarker zeigt durch seinen Verbleib den DNA-Doppelstrang an, der die höhere Überlebenswahrscheinlichkeit besitzt (Kapitel 2.3). Es wurde gefunden, dass zwei ansonsten gleiche Duplexe ein geschwindigkeitsabhängiges Verhalten zeigen: Während bei niedrigen Geschwindigkeiten ihre Überlebenswahrscheinlichkeit 50 : 50 gleichverteilt ist, tritt bei Zuggeschwindigkeiten ab $5 \mu\text{m/s}$ ein Ungleichgewicht auf. Es zeigte sich, dass der Duplex, welcher an seinen 3'-Enden belastet wird stabiler ist als der, welcher an seinen 5'-Enden belastet wird [50]. Dieser Effekt verstärkt sich bei noch höheren Geschwindigkeiten und konnte bis zu $40 \mu\text{m/s}$ gut dargestellt werden. Dieser kinetische Effekt tritt sowohl bei 30bp DNA als auch bei 20bp DNA auf. Durch eine chemische Modifikation können beide Duplexe so orientiert werden, dass jeder gleich dem anderen belastet wird, d.h. beide entweder an ihren 3'-Enden oder an ihren 5'-Enden. In diesen Fällen tritt keine Unsymmetrie in ihren Überlebenswahrscheinlichkeiten auf. Abbildung 6.1a zeigt eine Fluoreszenzaufnahme einer Stempelnoppe mit deutlicher Ausprägung des kinetischen Effekts, zu erkennen an den unterschiedlichen Helligkeiten der einzelnen quadratischen Kontaktfelder. Der Effekt tritt besonders an den Stellen auf, an denen sich die PDMS-Felder zuletzt von der Oberfläche ablösen. Hier bauen sich hohe Geschwindigkeiten bzw. Geschwindigkeitsgradienten auf. Abbildung 6.1b zeigt keine Unsymmetrien, da gleichgerichtete Waagen verwendet wurden. Die Aufnahme zeigt ein Experiment durchgeführt mit einer Separationsgeschwindigkeit von $20 \mu\text{m/s}$. Eine Auswertung der Fluoreszenzaufnahme entsprechend Kapitel 2.3 ist in Abbildung 6.2 zu sehen. Es ist die Fluoreszenzintensität und damit die Überlebenswahrscheinlichkeit des Probeduplexes Φ_S gegen den Ort aufgetragen (grüne Kurve, linke Achse). Die Ablösegeschwindigkeit v_z des

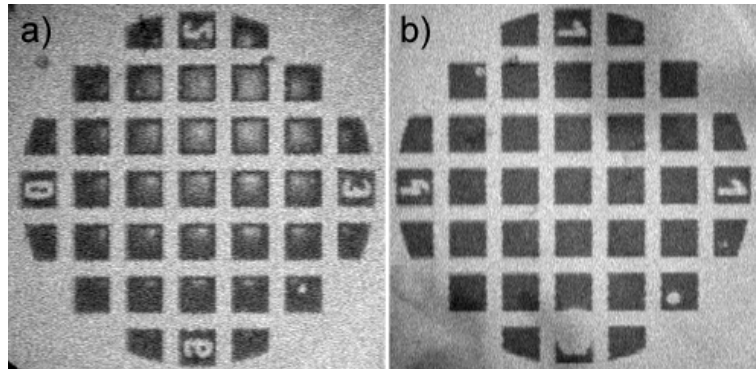


Abbildung 6.1: Fluoreszenzaufnahme der Kontaktflächen nach einem MFB Experiment. a) Auftreten einer Unsymmetrie in der Bindungsstärke der zwei verglichenen DNA-Duplexe (kinetischer Effekt) bei hohen Geschwindigkeiten. b) Symmetrische Verteilung der Fluoreszenzintensität sowohl zwischen PDMS Stempel und Objektträger als auch innerhalb der Kontaktfelder. Bei langsamen Zuggeschwindigkeiten oder gleichgerichteter Waage wird die Stabilität der DNA-Duplexe durch ihre Anzahl und Sequenz der Basenpaare festgelegt.

jeweiligen Ortes des Kontaktfeldes sowie die Umrechnung in die Kraftladungsrate ist ebenfalls gegen den Ort aufgetragen (schwarze Kurve, rechte Achsen). Der gestrichelte Teil ist dabei die Interpolation der Geschwindigkeit, am Ende des Ablösevorgangs. Dort war aufgrund der begrenzten Zeitauflösung der CCD-Kamera keine direkte RICM-Messung mehr möglich. Die Messung der Separationsgeschwindigkeit mittels RICM und deren Umrechnung in die Kraftladungsrate erfolgte wie in Kapitel 2.3 beschrieben. Es wird die wahrscheinlichste Abrisskraft F_{max} und die zugehörige Kraftladungsrate \dot{F} durch Monte-Carlo-Simulation berechnet. Basis dafür ist das FJC-Modell für den verwendeten PEG-Spacer mit einer Länge von $n = 68$ Monomeren. Aus den Einzelmolekül-AFM-Messungen an 30bp DNA-Oligomeren (Kapitel 5.1) konnte eine Potentialbreite $\Delta x = 2,9 \text{ nm}$ und eine natürliche Dissoziationsrate $k_{off} = 4,4 \cdot 10^{-15} \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden. Damit kann für jeden Punkt des Geschwindigkeitsprofils F_{max} und \dot{F} simuliert werden. Die Auswertung von 10 Kontaktfeldern ergibt, dass der kinetische Effekt, also die Unsymmetrie in der Überlebenswahrscheinlichkeit von Proben- und Referenzduplex bei einer Ladungsrate von $\dot{F} = 9,5 \cdot 10^5 \pm 1,6 \cdot 10^5 \text{ pN/s}$ und einer Abrisskraft von $F_{max} = 68,4 \pm 0,3 \text{ pN}$ einsetzt. Dies ist in Abbildung 6.2 am plötzlichen Anstieg der Überlebenswahrscheinlichkeit Φ_S des Probenplexes zu erkennen (Position $\approx 95 \mu\text{m}$). Der in 3'-3'-Richtung belastete Probenplex erweist sich also ab dieser Ablösegeschwindigkeit stabiler als der in 5'-5'-Richtung belastete Referenzduplex.

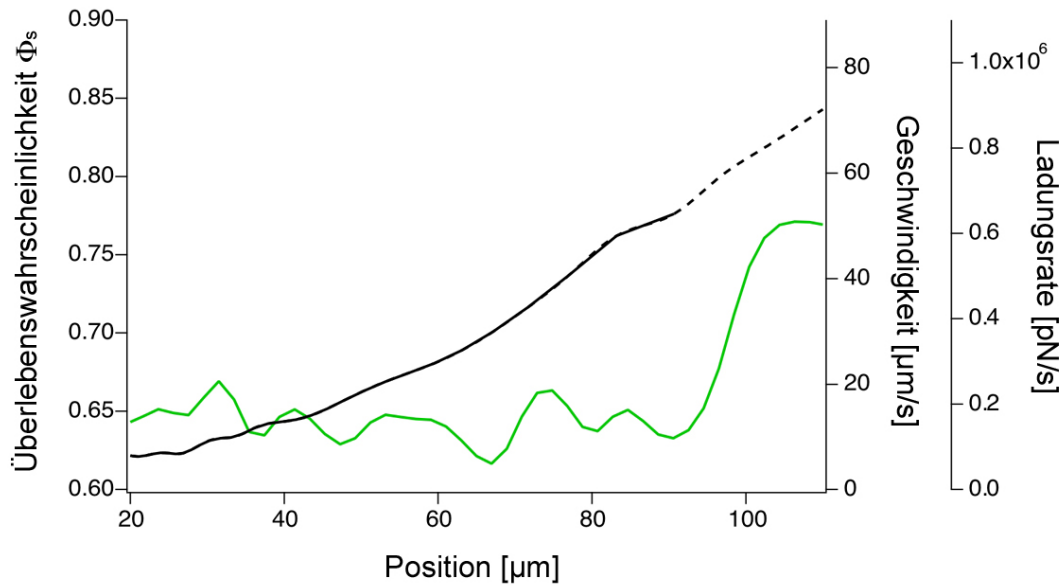


Abbildung 6.2: Überlebenswahrscheinlichkeit Φ_S des Probenduplexes (grüne Kurve, linke Achse) und tatsächliche Ablösegeschwindigkeit aus RICM-Messung und Umrechnung in Kraftladungsrate (schwarze Kurve, rechte Achsen).

6.2 Vergleich MFB – AFM und energetische Betrachtung

Trotz ausgereifter Einzelmolekültechnik konnte der kinetische Effekt nicht mit dem Rasterkraftmikroskop beobachtet werden. Dies könnte einerseits an einer zu großen Ungenauigkeit bei der Bestimmung der Federkonstanten des Cantilevers liegen. Diesem Problem wurde begegnet, indem im Durchschnitt drei Messreihen unterschiedlicher Zuggeschwindigkeiten mit demselben Cantilever durchgeführt wurde. Andererseits ist die Länge der verwendeten PEG-Spacer welche benötigt werden, um ein Einkoppeln der Cantileverschwingungen in die molekulare Bindung zu verhindern, zu beachten. Damit kommt man nur sehr schwer in den Bereich höherer Kraftladungsrate, welche für das Einsetzen der Unsymmetrie zwischen 3'-3' und 5'-5' Belastung nötig sind. Um gleiche Kraftladungsrate wie mit kürzeren PEG-Spacern zu erreichen, muss aufgrund der Elastizität der Polymere mit höheren Piezo-Geschwindigkeiten gezogen werden. Dies wird jedoch durch die Kapazitäten zur Datenaufzeichnung von Soft- und Hardware beschränkt.

Aus empirischen Messungen (Bestimmung der Schmelztemperatur) wurden Verfahren entwickelt, um das Bindungspotential von DNA zu berechnen [68, 69]. Mit dem „Nearest Neighbour“-Algorithmus lässt sich die Differenz der freien Gibbschen Energie zwischen gebundenem und freiem Zustand ΔG eines DNA-Duplexes in Abhängigkeit seiner Länge und

Sequenz bestimmen [69]. Dies erlaubt aber keine Rückschlüsse auf die tatsächliche Form der Potentiallandschaft. Zur Erklärung des kinetischen Effekts könnte man davon ausgehen, dass beim Anlegen einer äußeren Kraft die Potentiallandschaft so verändert wird, dass eine zweite, innere Barriere zum Vorschein kommt [70]. Abbildung 6.3 zeigt zwei Bindungspotentiale die ohne äußere Kraft die gleiche Potentialtiefe aufweisen (hellblau (a), hellrot (b)). Beim Anlegen einer Kraft dominiert jedoch eine innere Barriere das Potential a (dunkelblau)¹, was auch eine absolute höhere Potentialbarriere im Vergleich zur Bindung b bedeutet (dunkelrot) [71, 72]. Da jedoch der kinetische Effekt erst bei höheren

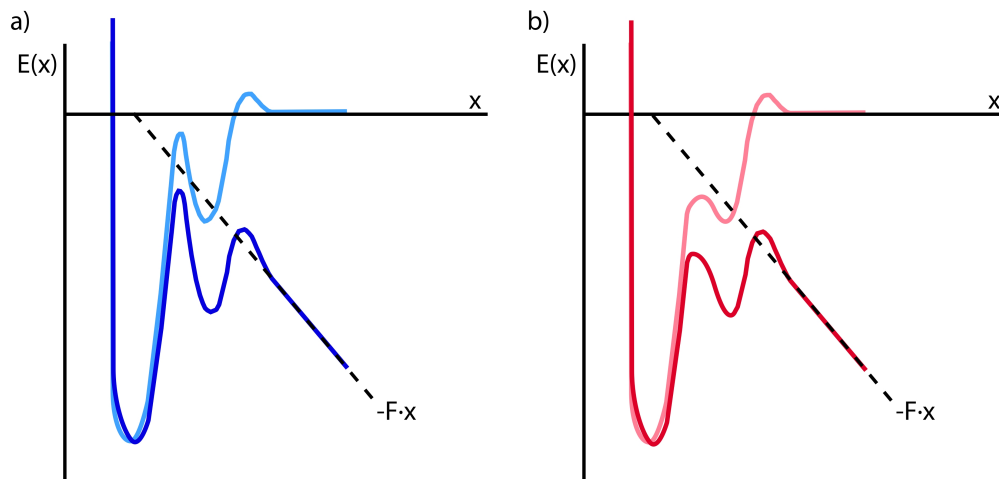


Abbildung 6.3: Energielandschaften mit innerer und äußerer Barriere. Im unbelasteten Zustand sind die äußeren Barrieren von Bindung a (hellblau) und b (hellrot) gleich hoch. Beim Anlegen einer Kraft F dominiert die innere Barriere das Potential a (dunkelblau) wohingegen im Potential b (dunkelrot) weiterhin die äußere Barriere höher ist. Außerdem ist Potential a absolut höher als Potential b.

Geschwindigkeiten und Ladungsraten ab $\dot{F} = 9,5 \cdot 10^5 \pm 1,6 \cdot 10^5 \text{ pN/s}$ auftritt, muss ein Modell, das diesen Sachverhalt erklärt, gefunden werden: Untersuchungen zeigen, dass doppelsträngige DNA lokal fluktuierend „Blasen“ ausbildet, also Regionen in denen sich eine oder mehrere Basenpaarungen spontan öffnen und wieder schließen. Dies geschieht mit einer Rate von $10^4 - 10^5 \text{ s}^{-1}$ [73]. Nimmt man nun diesen Wert als die Probiefrequenz ν_{off} an, welche üblicherweise eine Größenordnung von 10^{10} s^{-1} gemäß der viskos gedämpften atomaren Schwingungen im Bell-Evans-Modell hat [60, 63, 62, 74, 75], so erklärt sich das Einsetzen des kinetischen Effekts als Übergang von einem Quasi-Gleichgewichtszustand in ein kinetisches Regime [58]. Ist also bei niedrigen Zuggeschwindigkeiten das Überwinden der Potentialbarriere größtenteils durch thermische Fluktuationen der DNA getrieben, so muss im Bereich hoher Ladungsraten das gesamte Potential durch mechanische Leistung

¹Man kann davon sprechen, dass eine innere Barriere eine äußere Barriere dominiert, wenn die äußere Barriere mindestens um $k_B T$ niedriger ist [60]

überwunden werden. Setzt man Gleichung 4.12 in Gleichung 4.26 ein, so erhält man

$$F \cdot \Delta x = \Delta G_{off} + k_B T \cdot \ln \frac{\dot{F} \cdot \Delta x}{\nu_{off} \cdot k_B T} \quad (6.1)$$

Nimmt man nun an, dass beim Einsetzen des kinetischen Effekts $\dot{F} \cdot \Delta x \approx \nu_{off} \cdot k_B T$ gilt, so folgt aus Gleichung 6.1

$$F \cdot \Delta x \approx \Delta G_{off}. \quad (6.2)$$

Dies bedeutet, dass das gesamte Potential mechanisch überwunden wird. Dies stellt allerdings einen Grenzfall im Potentialmodell dar, welches darauf beruht, dass thermische Fluktuationen maßgeblich am Trennungsprozess beteiligt sind. Bei niedrigen Kraftladungsraten verhindert man also das Schließen der DNA-Blasen wohingegen bei hohen Trenngeschwindigkeiten ein Regime erreicht wird, indem mechanische Arbeit die DNA vollständig trennt [50]. Dabei zeigt sich die Asymmetrie zwischen 3'-3'-Belastung und 5'-5'-Belastung. Formt man Gleichung 4.12 um, so erhält man

$$\Delta G_{off} = -\ln \left(\frac{k_{off}}{\nu_{off}} \right) k_B T. \quad (6.3)$$

Nimmt man nun den durch AFM-Messungen (Kapitel 5.1) ermittelten Wert für die natürliche Dissoziationsrate $k_{off} = 4,4 \cdot 10^{-15} \text{ s}^{-1}$, so erhält man mit $\nu_{off} = 10^5 \text{ s}^{-1}$ aus Gleichung 6.3 für den Betrag der Potentialbarriere $|\Delta G_{off}| = 45 k_B T$. Berechnet man mittels „Nearest Neighbour“-Algorithmus den Unterschied der freien Gibbschen Energie zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand so ergibt sich ein $|\Delta G| = 49 k_B T$. Dieser Wert wurde für den verwendeten 30bp DNA-Duplex (Anhang B.4) ermittelt. Dazu wurde eine Korrektur des „Nearest Neighbour“-Algorithmus für DNA-Biochips nach Fotin et al. [76] verwendet. Diese Korrektur berücksichtigt die Anbindung eines der beiden Komplementär-Stränge der 30bp DNA an eine Oberfläche. Man sieht, dass der Wert für $|\Delta G_{off}|$ niedriger ist als $|\Delta G|$ was an sich nicht sinnvoll ist. Die Korrektur im „Nearest Neighbour“-Algorithmus berücksichtigt allerdings nur die Bindung eines ssDNA des Duplexes und nimmt den komplementären Strang in Lösung an. Diese Korrektur führt zu einer Reduzierung von $|\Delta G|$ auf $49 k_B T$ anstatt $62 k_B T$ im Falle beider ssDNA (Einzelstränge) in Lösung. Da im AFM und MFB Experiment beide ssDNA-Oligomere an Oberflächen angebunden sind bevor sie hybridisieren, kann man davon ausgehen, dass eine weitere Korrektur sinnvoll wäre. Es wird deshalb angenommen, dass $|\Delta G_{off}| \geq |\Delta G|$ gilt.

Nimmt man die in der Arbeit von Morfill et al. [67] ermittelten Werte für k_{off} und Δx bei Trennung in 5'-5'-Richtung, so folgt ein $|\Delta G_{off}| = 74 k_B T$. Mittels korrigiertem „Nearest Neighbour“-Algorithmus für die dort verwendete 30bp DNA, erhält man $|\Delta G| = 63 k_B T$. Diese, von den obigen abweichenden Werte, sind selbst bei einfacher Algorithmenkorrektur stimmig.

Daraus folgt also, dass die Gleichsetzung der DNA-Blasenfluktuation mit der Probierrate ($\nu_{off} = 10^5 \text{ s}^{-1}$) eine mögliche Erklärung des kinetischen Effekts sein kann.

Kapitel 7

Messungen an λ -Phagen-DNA

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Arbeit an kurzen DNA-Oligomeren mit einer Länge bis zu 30 Basenpaaren dargestellt. Dieses Kapitel behandelt nun Einzelmolekülexperimente an λ -Phagen-DNA im AFM. Diese doppelsträngige (ds)DNA ist mehrere tausend Basenpaare lang. Sie wurde mit dem mittels Lasersintern hergestellten Plastic-AFM untersucht. Aufgrund der Stabilität des AFMs konnten über 500 Elongations- und Relaxationskurven an ein und derselben λ -Phagen-DNA aufgenommen werden. Dies geschah unter konstanten Puffer- und Temperaturbedingungen (TEN-Puffer, 25 °C). Zu Beginn des Experiments wurde der AFM-Cantilever in Kontakt mit der Oberfläche eines Glasobjektträgers gebracht, auf dem die DNA zuvor immobilisiert war (Anhang B.5). Danach wurden einige Kraftkurven gefahren, um Mehrfachbindungen zu zerstören. Da aufgrund früherer Studien das Aussehen der Kraft-Abstandskurve von λ -dsDNA bekannt ist, wurde mit den Messungen begonnen, als nur noch ein Molekül zwischen Cantilever und Substratoberfläche gebunden war. Bei allen weiteren Wiederholungen des Hin- und Rückfahrens wurde der Glasobjektträger nicht mehr berührt.

7.1 Länge des BS-Plateaus beim Rückfahren

Die typische Kraft-Abstandskurve der Elongation und Relaxation von λ -Phagen-DNA unter physiologischen Pufferbedingungen (TEN-Puffer) ist in Abbildung 7.1 zu sehen. Beim Strecken der DNA (blaue Kurve) tritt bei 65 pN das charakteristische BS-Plateau auf, welches das Überstrecken der DNA auf das 1,7-fache ihrer ursprünglichen Länge zeigt. Danach kommt es bei weiterem Entfernen des Cantilevers von der Oberfläche zu einem erneuten Kraftanstieg. Nähert man den Cantilever wieder der Substratoberfläche (rote Kurve) so folgt die Kraft-Abstandskurve exakt dem vorangegangenen Profil. Die DNA liegt am Ende wieder in ihrer ursprünglichen Konformation vor. Die Hin- und Rückfahrgeschwindigkeit betrug in beiden Fällen 500 nm/s. Zieht man die dsDNA in höhere Kraftbereiche als die in Abbildung 7.1 gezeigten 150 pN, so erreicht man einen weiteren Übergangsbereich, den sogenannten Schmelzübergang (engl. Melting Transition) [44, 45]. Dort kommt es zu einer Trennung der Basenpaarungen und damit zu einer Öffnung des DNA-Doppelstranges.

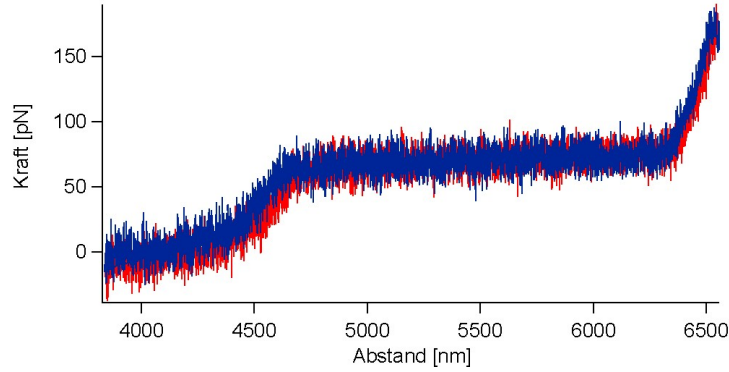


Abbildung 7.1: Kraft-Abstandskurve einer λ -Phagen-DNA. Hin- und Rückfahrkurve sind identisch wenn nicht in den Schmelzübergang hineingezogen wird.

Abbildung 7.2 zeigt Kraft-Abstandskurven zweier AFM-Zyklen mit Schmelzübergang. Die Cantileverbewegung wurde bei beiden Kurven am obersten Punkt für eine bestimmte Zeit gestoppt. Danach wurde die DNA wieder relaxiert (rote Kurven). Kurve a zeigt eine Haltedauer (Dwell Time) von 0,05 s. Man sieht, dass in der Rückfahrkurve (rot) ein kürzeres BS-Plateau als das Ursprüngliche vorhanden ist. Kurve b wurde mit einer Haltedauer von 0,5 s aufgenommen. In dieser Zeit haben sich die komplementären Einzelstränge vollständig getrennt. Dies ist an der Rückfahrkurve (rot) deutlich zu erkennen, da sie das Profil einer Einzelstrang-DNA (ssDNA) zeigt [44, 45]. Sie kann mit einem WLC-Modell oder erweitertem FJC-Modell mit den Parametern für ssDNA angefitet werden (Anhang C). Beide Kurven (a und b) sind in dieser Form allerdings nur möglich, wenn ein Einzelstrang sowohl an Cantilever und Substrat gebunden hat und der komplementäre an eine der beiden Oberflächen. Die Zyklen aus Elongations- und Relaxationskurve sind außerdem wiederholbar. Daraus folgt, dass die beiden Einzelstränge nach vollständiger Relaxation wieder hybridisieren.

Es wurden nun Hin- und Rückfahrkurven mit unterschiedlichen Haltedauern im Schmelzübergang aufgenommen. Dabei wurde mit gleicher Geschwindigkeit bis zu einer Kraft von $200 \pm 15 \text{ pN}$ gezogen. Nach einer bestimmten Haltedauer wurde die DNA dann relaxiert. Abbildung 7.3 zeigt die Länge des BS-Plateaus in der Rückfahrkurve in Abhängigkeit der Haltedauer. Es wurde für jede Haltedauer das arithmetische Mittel \bar{x} der Plateaulängen berechnet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung ($\pm \sigma$)¹ an. Die Messdaten wurden

¹Das arithmetische Mittel entspricht dem wahrscheinlichsten Wert und ist definiert als $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$. Die Standardabweichung ist definiert als $\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$. Bei einer genügend großen Anzahl von Messwerten kann man die Häufigkeit mit der die einzelnen Messwerte auftreten gegen den Messwert x auftragen und erhält eine Gaußsche Normalverteilung. Das arithmetische Mittel \bar{x} entspricht dem Maximum dieser Verteilung. Die Standardabweichung σ beschreibt den Bereich $\bar{x} \pm \sigma$ in den die Messwerte mit einer statistischen Sicherheit von $P = 68,3\%$ fallen. Dies entspricht dem Bereich der Gaußschen Normalverteilung vom Maximum bis zu den Wendepunkten.

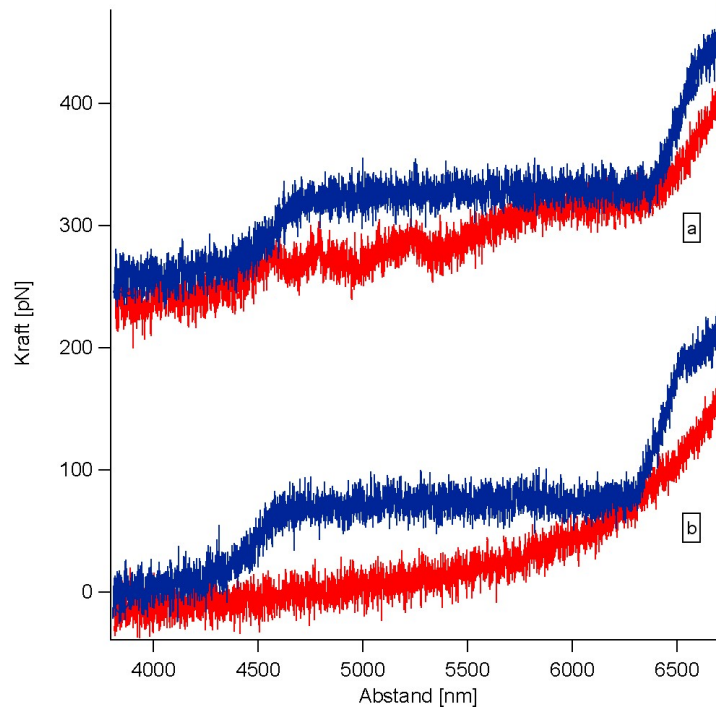


Abbildung 7.2: Kraft-Abstandskurve einer λ -DNA mit Schmelzübergang. a) 0,05 s Haltedauer im Schmelzübergang. Das verbleibende BS-Plateau in der Rückfahrkurve (rot) zeigt, dass nur ein Teil der DNA als Einzelstrang vorliegt. b) 0,5 s Haltedauer. Die Basenpaarungen haben sich vollständig geöffnet und die Rückfahrkurve (rot) zeigt das Profil eines Einzelstranges.

mit folgender erweiterten Exponentialfunktion gefittet:

$$y(x) = y_0 + A \cdot e^{\frac{-(x-x_0)}{\tau}} \quad (7.1)$$

Die Parameter für den Fit in Abbildung 7.3 sind dabei: $y_0 = 88,4 \pm 42,4 \text{ nm}$; $A = 7,28 \cdot 10^2 \pm 96,9 \text{ nm}$; $\tau = 9,06 \cdot 10^{-2} \pm 2,88 \cdot 10^{-2} \text{ s}$; $x_0 = 1,00 \cdot 10^{-2} \text{ s}$. Man sieht eine deutliche Abhängigkeit der Länge des Rückfahr-Plateaus von der Haltedauer, also von der Zeit in der die Piezobewegung im Schmelzübergang gestoppt wurde. Dies stimmt gut mit den Ergebnissen der Studie von Clausen-Schaumann et al. [45] überein, in der auch gefunden wurde, dass ab einer Haltedauer von 0,50 s die Rückfahrkurve vollständig der eines DNA-Einzelstranges entspricht. Die große Standardabweichung beim ersten Messpunkt mit einer Haltedauer von 0,01 s zeigt, dass sowohl Plateaus mit großer Länge (bis zu 1300 nm) als auch bereits kürzere Plateaus auftreten. Die komplette Plateaulänge von 1690 nm, welche der des BS-Plateaus in der Elongationskurve entspricht, ist allerdings nur messbar, wenn die Haltedauer im Schmelzübergang null ist.

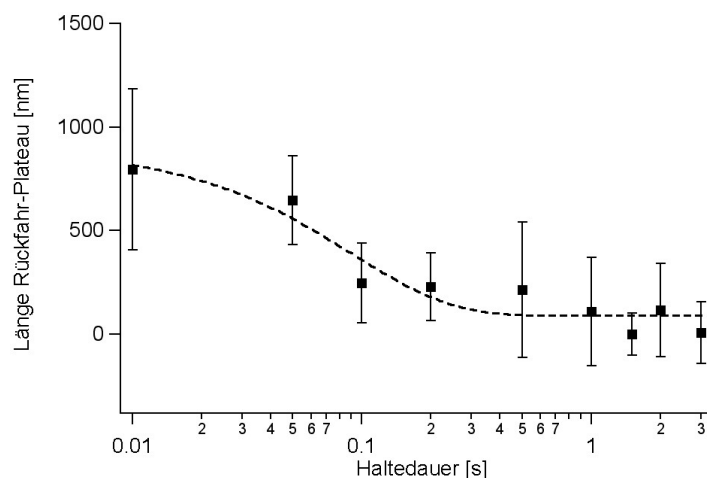


Abbildung 7.3: Länge des BS-Plateaus der λ -DNA in der Kraft-Abstandskurve der Relaxation aufgetragen gegen die Haltedauer im Schmelzübergang. Gestrichelte Linie: Erweiterter exponentieller Fit.

7.2 Kraftrelaxation im Schmelzübergang

Bislang wurde eine AFM-Messung als Kraft-Abstandskurve dargestellt. Anstatt die gemessene Kraft gegen den Abstand Cantileverspitze-Substrat aufzutragen, kann man diese auch gegen die Zeit auftragen. Diese Darstellung wurde gewählt, um die Einzelstrangbildung im Schmelzübergang (Melting Transition) näher zu untersuchen. Abbildung 7.4 zeigt ein solches Diagramm (dunkelblaue Kurve, linke Achse). Zusätzlich ist die Piezobewegung aufgetragen (hellblaue lineare Kurve, rechte Achse). Man kann drei Bereiche unterscheiden in denen der Cantilever durch Piezoausdehnung von der Oberfläche weg bewegt wurde (ansteigende Gerade), die Zeit in der die Piezobewegung gestoppt ist (Horizontale) sowie die erneute Annäherung an die Oberfläche des Glasobjektträgers (abfallende Gerade). Zu erkennen ist in diesen drei Bereichen das Ansteigen der Kraft inklusive BS-Plateau bei Streckung, eine Kraftabnahme während der Haltedauer, sowie die Kraftabnahme in Form der Einzelstrangrelaxation bei Rückfahrt zur Oberfläche. Im Bereich der Haltedauer (Dwell Time) wurde ohne Rückkopplungsmechanismen (Force-Feedback) nur die Kraft aufgezeichnet. Die deutliche Abnahme der Kraft in diesem Bereich, lässt sich mit der Exponentialgleichung 7.1 anfitzen (rote Kurve). Man erhält folgende Parameter: $y_0 = 1,65 \cdot 10^2 \pm 0,107 \text{ pN}$; $A = 64,1 \pm 0,432 \text{ pN}$; $\tau = 0,117 \pm 1,36 \cdot 10^{-3} \text{ s}$; $x_0 = 1,45 \text{ s}$.

Allgemein bezeichnet man als Relaxationszeit die für einen Prozess charakteristische Zeit, in welcher stationäre Bedingungen erreicht werden. Wenn die Relaxation einer Größe $y(t)$ einem exponentiellen Gesetz wie in Gleichung 7.1 folgt, so bezeichnet τ die zugehörige Relaxationszeit. Dies ist hier, wie im vorangegangenen Abschnitt der Fall.

Misst man nun für alle Kurven die Differenz der Kraft zwischen Beginn und Ende der Haltedauer, so erhält man die Verteilung in Abbildung 7.5. Es sind die Mittelwerte mit

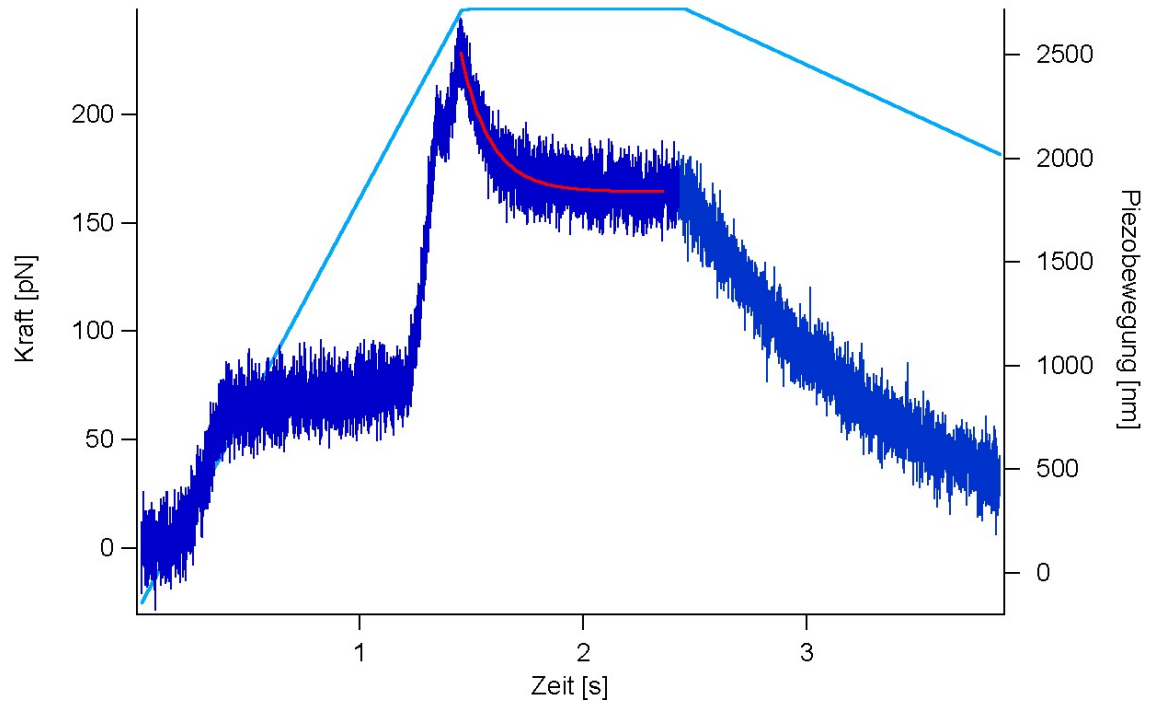


Abbildung 7.4: Streckung und Relaxation von λ -DNA aufgetragen gegen die Zeit (dunkelblau, linke Achse). Piezobewegung (hellblau, rechte Achse). Der Kraftverlauf während der Haltedauer im Schmelzübergang wurde exponentiell gefittet (rot).

zugehöriger Standardabweichung aufgetragen. Die Messdaten wurden wieder mit Gleichung 7.1 gefittet (gestrichelte Kurve). Man erhält: $y_0 = 50,8 \pm 1,62 \text{ pN}$; $A = -43,2 \pm 3,64 \text{ pN}$; $\tau = 9,79 \cdot 10^{-2} \pm 1,98 \cdot 10^{-2} \text{ s}$; $x_0 = 1,00 \cdot 10^{-2} \text{ s}$. Der hieraus ermittelte Wert für die Relaxationszeit τ ist eine Mittelung über die gemessenen Kurven. Den selben Wert hätte man erhalten, hätte man jeden Kraftverlauf während der Haltedauer wie in Abbildung 7.4 einzeln gefittet und daraus das Mittel gebildet.

Betrachtet man jede einzelne Kurve genauer, so stellt man fest, dass ein Großteil (ca. 60 %) nicht nur die einfach-exponentielle Kraftrelaxation während der Haltedauer zeigt. Wie in Abbildung 7.6 zu sehen ist, erfolgt die Abnahme der Kraft oft in diskreten Schritten mit der Ausbildung von Plateaus konstanter Kraft. In dieser Abbildung sind mehrere Kurven mit unterschiedlichen Plateaulängen und Haltedauern übereinander gelegt. Von der Position maximaler Kraft und Ausdehnung der dsDNA relaxiert diese während der Haltedauer auf ein erstes Plateau und bis zu zwei weitere Bereiche konstanter Kraft. Die Kraftdifferenz der drei Plateaus beträgt untereinander $13,2 \text{ pN}$.

So wie nicht jede Kraft-Zeitkurve Plateaus zeigt, so werden auch in einigen Kurven nicht alle drei Plateaus sichtbar ausgebildet. Ob im weiteren Verlauf der Rückfahrkurve ein BS-Plateau ausgebildet wird oder ein DNA-Einzelstrang (ssDNA) vorliegt, hängt nicht vom Ausbilden aller drei Plateaus während des Piezostops ab. Entscheidend ist dafür die

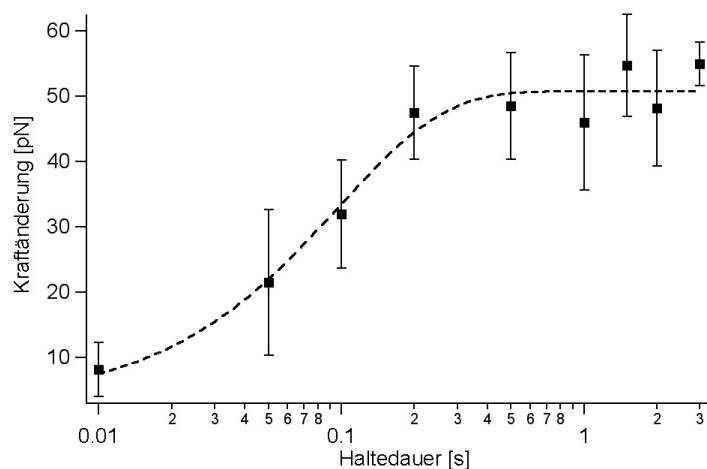


Abbildung 7.5: Kraftrelaxation der λ -DNA während der Haltedauer im Schmelzübergang. Gestrichelte Linie: Erweiterter exponentieller Fit.

Länge der Haltedauer wie oben gezeigt (Kapitel 7.1). Die Wahrscheinlichkeit, dass das niedrigste Niveau erreicht wird, hängt von der Haltedauer ab. Ab 3 s Haltedauer wird es in jedem Fall erreicht.

Eine vollständige Erklärung dieses Verhaltens ist nicht trivial. Der Prozess ist in dem Sinne reversibel, dass die DNA am Kraftnullpunkt nach einem Elongations-Relaxations-Zyklus wieder zu einem Doppelstrang hybridisiert und eine weitere, gleiche Kraft-Abstandskurve aufgezeichnet werden kann. Es muss also auch beim Durchlaufen einer Einzelstrangbildung (Schmelzübergang) ein DNA-Strang an beiden Oberflächen angebunden sein, während der andere an nur einer Oberfläche permanent gebunden ist. Wäre auch er an beiden Oberflächen angebunden, so sollte keine ssDNA-Kraftkurve beobachtbar sein. Dies wäre nur dann möglich, wenn er gleichzeitig einen Strangbruch aufweisen würde [45]. Man nehme nun eine dsDNA an, wovon ein Einzelstrang (ssDNA) eine Bruchstelle aufweist. Desweiteren gehe man davon aus, dass die erste Kraftabnahme während der Haltedauer AFM bedingt ist (z.B. Wegfall hydrodynamischer Kräfte). So könnte es sich beim ersten Plateau und der Abfall zum Zweiten um das Abschmelzen einer Hälfte des gebrochenen ssDNA-Stranges handeln. Das zweite Plateau und der Kraftabfall zum dritten (letzten) Plateau wäre dann das Abschmelzen der zweiten Hälfte. Beide Hälften sowie der vollständige Komplementärstrang wären weiterhin an Cantilever und Objektträger gebunden. So könnte eine Hybridisierung bei Abwesenheit einer von außen angelegten Kraft stattfinden.

Eine andere Möglichkeit wäre das Vorhandensein großer Regionen der dsDNA mit verstärktem ($A = T$) oder ($G \equiv C$) Gehalt. Da die ($A = T$) Bindungen nur zwei Wasserstoffbrücken ausbilden ist ihre Stärke geringer als die der ($G \equiv C$) Bindungen (Anhang A). Setzt sich die Blasenbildung der DNA (vgl. Kapitel 6.2) zu einem kooperativen Prozess fort, so könnte man zu Beginn vom Öffnen einer großen DNA-Blase ausgehen, bestehend aus einer Ansammlung von ($A = T$) Bindungen (Abfall zum ersten Plateau). Danach öffnet

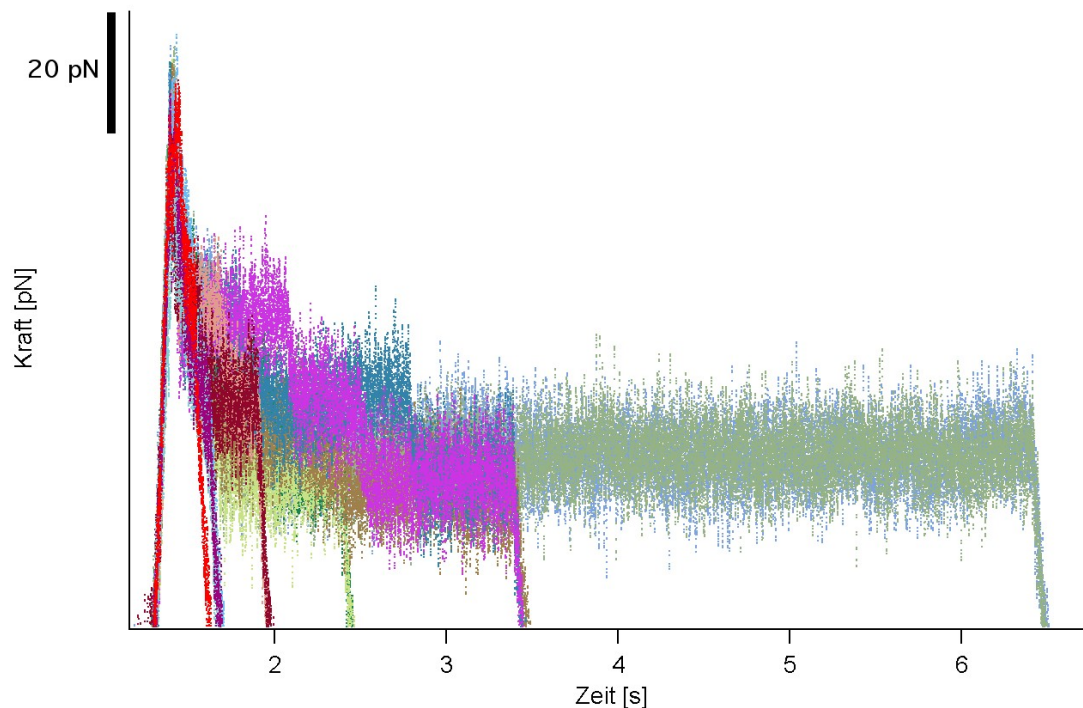


Abbildung 7.6: Die Kraftrelaxation während der Haltedauer im Schmelzübergang erfolgt nicht nur einfach exponentiell sondern oft in diskreten Schritten zwischen drei Bereichen konstanter Kraft (Plateaus).

sich eine große DNA-Blase einer Region mit gemischtem Gehalt an ($A = T$) und ($G \equiv C$), was dem Abfall zum zweiten Plateau entspricht. Schließlich folgt aufgrund der großen Bindungsenergie das Öffnen einer Region vorwiegend bestehend aus ($G \equiv C$) Basenpaaren. Die Größe der drei Bereiche muss dabei so unterschiedlich sein, dass wie in Abbildung 7.6 gezeigt, die jeweilige Kraftrelaxation (zufällig) den gleichen Wert aufweist. Die Öffnung muss dabei für alle Basenpaare eines Bereichs nahezu gleichzeitig erfolgen.

Bei λ -DNA mit selbstkomplementären Sequenzen, besteht die Möglichkeit, dass sich nach dem Abschmelzen eines DNA-Stranges sogenannte „Hairpin“ Strukturen formen. Dies sind Basenpaarbindungen eines Einzelstranges untereinander. Der Vorgang wäre in Kraftkurven zu sehen, indem sich in der Rückfahrkurve ein Plateau in der Höhe von 20 pN am Bereich des Endes des BS-Plateaus ausbildet [44]. Das konnte hier jedoch nicht beobachtet werden. Die Kräfte der Kurven wie in Abbildung 7.2 gezeigt „springen“ entweder auf das Elongationsprofil (a) oder gehen direkt auf Null (b). Ein signifikanter Beitrag aus der Bildung solcher „Hairpin“ Strukturen auf die Kraftplateaus während der Haltedauer ist deshalb unwahrscheinlich.

Kapitel 8

Messungen an P-Pili von *Escherichia coli*

Escherichia coli ist ein gramnegatives stäbchenförmiges Bakterium, welches in zahlreichen genetischen Varianten (Stämmen) vorkommt. Üblicherweise besiedelt es symbiotisch den menschlichen Darmtrakt wo es einerseits den Stoffwechsel fördert und andererseits die Ausbreitung von anderen schädlichen Keimen eindämmt¹ [77]. Besiedelt *E. coli* jedoch andere Orte des menschlichen Organismus, so kann es zu schweren Infektionen kommen (Harnwegsinfektion, Nierenentzündungen u.a.) [78]. Das Bakterium besitzt die Fähigkeit, sich durch Flagellenbewegung² entlang chemischer Gradienten fortzubewegen (Chemotaxis). Außerdem kann es sich mit Hilfe härchenartiger Strukturen, den P-Pili (sing. Pilus), an humane Epithelzellen anheften. Die hier präsentierte Forschung behandelt das mechanische Verhalten der P-Pili von *E. coli* unter von außen angelegten Kräften. Zusätzlich wurde die Bindungsfähigkeit des an ihrem distalen Ende befindlichen Adhäsins PapG untersucht. Für die Experimente wurde ein gentechnisch veränderter Bakterienstamm verwendet, der weder pathogen ist, noch Flagellen ausbildet [79].

Die P-Pili bestehen aus ca. 1000 Immunglobulin-artigen Untereinheiten PapA³. Diese sind helikal angeordnet und bilden eine stabförmige Struktur aus [80, 81, 82, 83, 84]. Die PapA Einheiten sind durch hydrophobe Wechselwirkungen aneinander gebunden [85, 86, 87, 88]. An dem distalen Ende des Pilus befindet sich ein Fibrille aus linear angeordneten PapK, PapE und PapF Einheiten mit dem Adhäsins PapG als Abschluss. Dieses bindet spezifisch an das disaccharide Glycolipid Galabiose, welches auf humanen Epithelzellen präsent ist [79, 89, 90, 91].

¹Es existieren jedoch auch darmpathogene Stämme von *E. coli* wie zum Beispiel EHEC.

²Drehen sich die Motorproteine und damit die Flagellen gegen den Uhrzeigersinn, so entsteht eine gebündelte spiralförmige Drehung der Flagellen und eine Fortbewegung des Bakteriums. Drehen die Motorproteine im Uhrzeigersinn, so öffnet sich der Flagellenverband und die Zelle taumelt.

³Pap = Protein assoziiert mit Pyelonphritis

8.1 Entstapelung und Rückstapelung der Pilus-Quartärstruktur

Um das mechanische Verhalten der P-Pili im Einzelmolekülexperiment zu untersuchen, werden die Bakterienzellen zunächst auf einer Oberfläche angebunden (Anhang B.8). Es können dann AFM-Messungen unter physiologischen Pufferbedingungen durchgeführt werden. Dabei werden immer nur einzelne festangebundene Zellen mit der Cantileverspitze kontaktiert. Der Einsatz des Quasi-Trans DIC Verfahrens ermöglicht es, die Zellen mit hoher optischer Auflösung abzubilden (siehe Kapitel 2.1.2.3). Bindet ein Pilus an den AFM-Cantilever ergibt sich eine charakteristische Kraft-Abstandskurve bei Streckung und Relaxation [92]. Abbildung 8.1 zeigt das Dehnungsverhalten eines einzelnen Pilus. Aufgrund

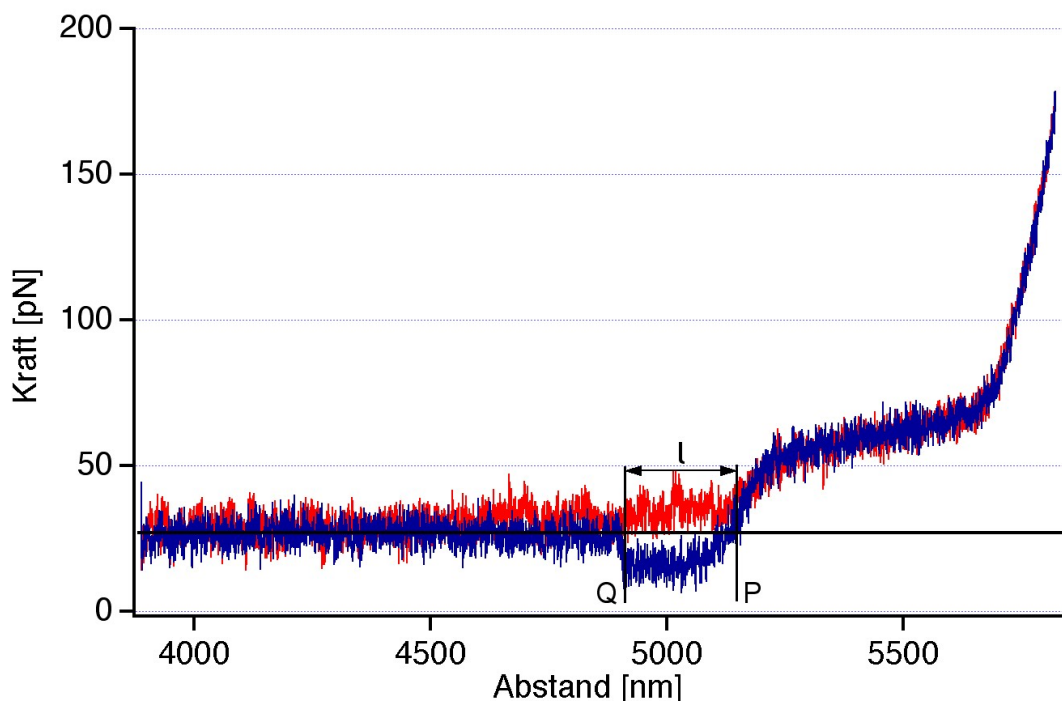


Abbildung 8.1: Kraft-Abstandskurve eines P-Pili von *E. coli*. Rot: Streckung. Blau: Relaxation mit Hysterese.

des fingerabdruckartigen Kraft-Abstandsprofils kann man bei jeder Kurve prüfen, ob ein oder mehrere Pili an die Cantileverspitze gebunden haben. Zu Beginn der Streckung steigt die Kraft rasch an und geht direkt in ein langes Plateau über. Dieses Plateau hat seinen Ursprung in dem Öffnen der helikal gestapelten Struktur der PapA Domänen. Es folgt ein zweiter Plateau-artiger Bereich mit einem steilen Kraftanstieg vor dem Abriss. Dies resultiert aus einer zunehmend linearen Anordnung der PapA Einheiten sowie einer elastischen Dehnung des Pilus. Der Pilus kann bis zum fünffachen seiner ursprünglichen Länge gestreckt werden, wobei der größte Längenzuwachs mit der Ausbildung des Kraftplateaus

bei 27 pN einhergeht. Die Rückfahrkurve ist bis auf einen Bereich der Hysterese am Beginn (von rechts kommend) des Plateaus mit der Dehnungskurve identisch.

Diese Hysterese sollte nun genauer untersucht werden. Es gelang, an ein und demselben Pilus 70 Kraftkurven mit acht unterschiedlichen Zug- und Relaxationsgeschwindigkeiten von 200 bis 7000 nm/s aufzunehmen. Die Bindung des Pilus an den Cantilever erfolgte dabei unspezifisch, was höhere Kräfte ermöglicht. Die Hysterese in der Rückfahrkurve wurde exakt vermessen um einen Hinweis auf ihren Ursprung zu erhalten. Offensichtlich handelt es sich dabei um einen Prozess, der die Rückstapelung⁴ der PapA Domänen zur helikalen Struktur des Pilus verzögert. Es wurde in jeder Rückfahrkurve die Länge l der Hysterese gemessen (siehe Abbildung 8.1). Die linke Begrenzung der Länge l ist der Anstieg der Hysterese zum Rückfahrplateau (Punkt Q). Die rechte Begrenzung ist der Schnittpunkt eines linearen Plateaufits mit dem Kraftabfall am Beginn der Hysterese (Punkt P). Dieser Referenzpunkt P wurde in einer „Masterkurve“ ermittelt (Relaxationsgeschwindigkeit 200 nm/s) und für alle weiteren Kurven festgehalten. Die Messungen ergeben, dass die Hysterese mindestens 5 % der Konturlänge L_c des Pilus umfasst (Bereich von $0,61$ bis $0,66 \cdot L_c$). Bei höheren Geschwindigkeiten vergrößert sich die Hysterese und das Rückstapeln der PapA Einheiten geschieht erst bei $0,59 \cdot L_c$. Der Punkt P markiert außerdem die minimale Ausdehnung bei Streckung, ab der beim anschließenden Rückfahren eine Hysterese auftritt. Interessanterweise bleibt der Bereich rechts davon für alle Geschwindigkeiten erhalten. Die Rückstapelung der PapA Domänen findet also frühestens bei $0,61 \cdot L_c$ statt und ähnelt einem Phasenübergang erster Ordnung wie er zum Beispiel bei unterkühlten Flüssigkeiten vorkommt. Dazu ist ein Nukleationskeim nötig, der ab einer bestimmten Mindestgröße in einem metastabilen Zustand eine Änderung des Aggregatzustandes hervorruft.

Um den Vorgang der PapA-Rückstapelung vergleichbar zu erklären, wurden Kraft-Abstandskurven von Pili unterschiedlicher Länge aufgenommen. Wie bereits erwähnt, ist der Bereich rechts des Punktes P (Abbildung 8.1) für alle Geschwindigkeiten erhalten. Es wurden nun die bei 200 nm/s aufgenommen Kurven unterschiedlicher Pili in diesem Bereich auf eine Referenzkurve durch Superposition skaliert. Man erhält damit einen Skalierungsfaktor $k = L_0/L$. Dementsprechend skaliert auch die Hysteresislänge l . Geht man nun von einem Nukleationskeim aus, der einen Teil der Hysteresislänge ausmacht, so sollte dieser konstant und unabhängig von der tatsächlichen Piluslänge sein. Für die Referenzkurve gilt also:

$$l_0 = a_0 + b_0. \quad (8.1)$$

Dabei bezeichnet a_0 die Länge des Nukleationskeimes und b_0 einen längenabhängigen Anteil der Hysterese. Die Länge l der Hysterese eines Pilus ist also allgemein:

$$l = a_0 + b. \quad (8.2)$$

Skaliert man nun mit dem Faktor k , so bleibt die Länge des Nukleationskeimes a_0 konstant:

$$l' = k \cdot l = k \cdot a_0 + k \cdot b = k \cdot a_0 + b_0. \quad (8.3)$$

⁴Es wird der Begriff „Rückstapelung“ verwendet, da die Ig-artigen Pap Einheiten in ihrer Anordnung verändert werden. Sie werden jedoch nicht entfaltet.

Mit $b_0 = l_0 - a_0$ gilt:

$$l' = k \cdot a_0 + l_0 - a_0 = l_0 + a_0 \cdot (k - 1). \quad (8.4)$$

Trägt man nun die skalierte Länge der Hysterese l' gegen die originale Länge l auf und fittet mit Gleichung 8.4 so erhält man für den Fitparameter $a_0 = 47 \pm 17 \text{ nm}$ als Länge eines Nukleationskeimes. Bei einer Pilusstreckung von $0,61 \cdot L_c$ entspricht dies 20 ± 7 PapA Einheiten.

8.2 Spezifische Bindungskräfte der PapG-Adhäsine

Am distalen Ende der Pili von *E. coli* befindet sich eine PapG Einheit, die spezifisch an Galabiose bindet [90]. Dieses Glykolipid ist auf menschlichen Epithelzellen präsent. Um das Bindungspotential zu vermessen wurde die Galabiose auf einen AFM Cantilever angebunden (Anhang B.8). Zur Kontrollmessung wird lösliche Galabiose verwendet. Diese besetzt die PapG Einheiten der Pili und blockt so die spezifische Wechselwirkung vollständig (Abbildung 8.2). Abbildung 8.3a zeigt eine typische Kraft-Abstandskurve wenn mit einem

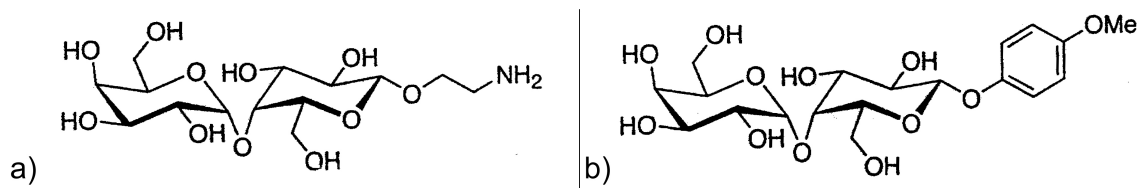


Abbildung 8.2: a) Amino-funktionalisierte Galabiose. Diese wird zur Messung der spezifischen Wechselwirkung mit PapG an den AFM-Cantilever angebunden. b) Lösliche Galabiose zum blocken der PapG Adhäsine im Kontrollexperiment.

Galabiose-funktionalisiertem Cantilever Pili einer *E. coli* Zelle kontaktiert wurden. Da die PapG-Galabiose Bindung vor einem Abriss des Pilus öffnet, werden niedrigere Kräfte als bei unspezifischer Anbindung erreicht [92]. Dies erscheint sinnvoll, da das Bakterium damit auch nach dem Auftreten hoher Scherkräfte die Möglichkeit hat, sich an einem neuen Ort anzusiedeln. Abbildung 8.3b zeigt die Verteilung der gemessenen Dissoziationskräfte in einem Histogramm. Man erkennt eine deutlich bimodale Verteilung mit Maxima bei 27 und $49 \pm 3 \text{ pN}$. Das Maximum bei 27 pN resultiert aus der hohen Wahrscheinlichkeit der Bindungsöffnung während des Elongationsplateaus. Man kann nun die molekulare Bindung charakterisieren, indem man mit Hilfe einer Monte-Carlo Simulation die Breite des Bindungspotentials Δx und die natürliche Dissoziationsrate k_{off} berechnet [55]. Dazu nimmt man eine Kraft-Abstandskurve eines Pilus und berechnet die Wahrscheinlichkeit der Bindungsöffnung für jeden Punkt dieser Kurve. Entsprechend Gleichung 4.23 wird die Dissoziationswahrscheinlichkeit $p(F) = \lambda(F) \cdot \Delta t$ mit einer Zufallsvariable R zwischen null und eins verglichen. Ist $p(F)$ größer als R so entspricht die Kraft an diesem Punkt der

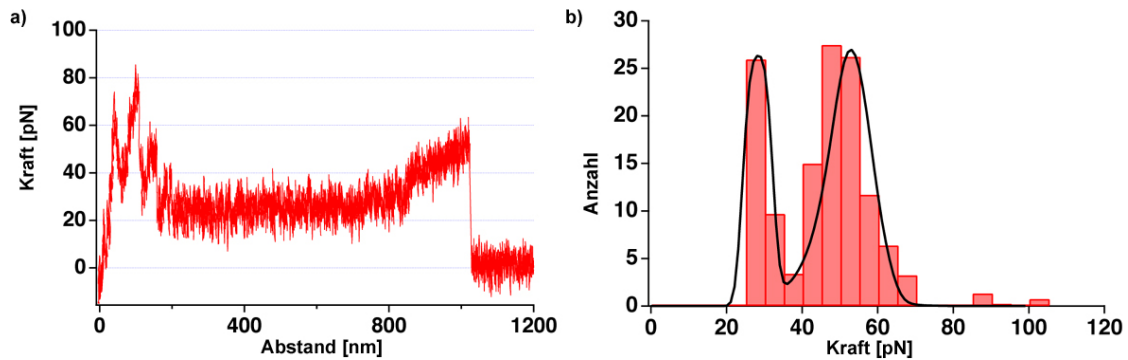


Abbildung 8.3: a) Typische Kraft-Abstandskurve bei Messung mit Galabiose-funktionalisiertem AFM-Cantilever. Die PapG-Galabiose Bindung öffnet bevor der Pilus beschädigt wird. b) Histogramm der gemessenen Bindungskräfte mit Maxima bei 27 und $49 \pm 3 \text{ pN}$. Schwarze Kurve: Monte-Carlo Simulation zur Bestimmung von Δx und k_{off} .

Dissoziationskraft. Dabei ist $\Delta t = \frac{\Delta z}{v}$ das Sampling Intervall Δz geteilt durch die Zuggeschwindigkeit v und entspricht der Dauer, für die die Kraft an einem Punkt angelegt ist. Die Verteilung wird nach den Längen der Pili der Experimente gewichtet. Durch Variation der Fitparameter Δx und k_{off} wird die Simulation an die Messwerte angefitet. Man erhält damit die Potentialweite $\Delta x = 0,7 \pm 0,15 \text{ nm}$ und die natürliche Dissoziationsrate $k_{off} = 8,0 \cdot 10^{-4} \pm 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ für die spezifische PapG-Galabiose Bindung.

Die erhaltenen Bindungskräfte sind in guter Übereinstimmung mit den von Typ-IV Pili berichteten Werten [93, 94]. Der Mechanismus der Entstapelung der P-Pili verhindert einerseits ein zu frühes Ablösen von der Wirtszelle und andererseits schützt das Öffnen der PapG-Galabiose Bindung vor einer Beschädigung der Pili bei höheren Scherkräften. Das Auftreten der Hysterese bei der Rückstapelung verlängert dabei zeitlich den gestreckten Zustand, was die Wahrscheinlichkeit einer erneuten Bindung an Epithelzellen erhöht.

Kapitel 9

Ausblick

In dieser Arbeit wurden die Reaktionen von molekularen und supramolekularen Strukturen auf von außen angelegte Kräfte untersucht. Dies soll zu einem besseren Verständnis von Funktion und Organisation auf intra- und interzellulärer Ebene beitragen. Grundlage der biophysikalischen Forschung wird, wie im vorliegenden Fall, auch in Zukunft die Weiterentwicklung von Instrumenten und Methoden sein. Dies bedeutet das Erfinden völlig neuer Verfahren aber auch die stetige Verbesserung vorhandener Techniken. Eine erhöhte Orts- und Zeitauflösung, effektive Datenauswertung und die Kombination verschiedener Verfahren werden entscheidend für weiterführende Ergebnisse sein.

Die Manipulation von einzelnen Molekülen ist zu einer der wichtigsten Methoden der Biophysik geworden. So werden dem „Nano-Baukasten“ immer neue Bausteine hinzugefügt, die einmal Teil einer neuen molekularen Maschine sein können oder für ihren Zusammenbau nötig sind. Entscheidend für die Entstehung einer solchen molekularen Maschine, die ihre Vorbilder in den bereits in der Zelle vorhandenen hat, wird dabei die Fähigkeit der einzelnen Bausteine zur Selbstorganisation sein. So kann ein komplexer supramolekularer Verband entstehen, der mehr ist als die Summe seiner Teile. Die gezeigten Ergebnisse spielen dabei insofern eine wichtige Rolle, da das Verhalten eines Moleküls beim Anlegen einer Kraft, aber insbesondere beim Verschwinden derselben die Mechanismen der Selbstorganisation studieren lässt.

Die Erforschung des Erbmoleküls DNA hat in den letzten Jahren einen enormen Erkenntnisgewinn gebracht und dennoch können immer wieder neue Eigenschaften entdeckt werden. Dabei ist die Arbeit an DNA und RNA als eine besondere, an der Schnittstelle zwischen Informationsspeicherung und räumlich struktureller Organisation angesiedelte, zu sehen. Die Bedeutung der DNA ist dabei weder auf ihre Eigenschaft als negativ geladenes, dehnbares Molekül noch als Träger der Erbinformation allein aufgrund ihrer Basenfolge beschränkt [95, 96]. Entscheidend für Aufbau und Funktion von Zelle und Organismus ist, welche Gene tatsächlich aktiv sind, d.h. an welchen Teilen der DNA Transkription stattfindet. Dies wird durch eine Vielzahl von Faktoren bestimmt. Welche Nukleosomen und DNA-Abschnitte für die Transkription zugänglich sind hängt von der chemischen Modifikationen von DNA und Zellkernproteinen (Histone) wie z.B. Phosphorylierung, Methylierung und Acetylierung ab [97]. Diese für den Phänotyp entscheidende Kombination aus Genom

und Aktivität stellt den Inhalt des sogenannten Epigenoms dar. Das Verständnis dieses komplexen Mechanismus ist Grundlage für die Erklärung von Gewebedifferenzierung und Spezialisierung. Die Physik mit ihren Möglichkeiten zur quantitativen Analyse von atomaren und molekularen Wechselwirkungen, aber auch von komplexen Systemen, hat die Möglichkeiten die entscheidenden biologischen Fragen, von der Proteinfaltung bis hin zur Entstehung von Bewusstsein und Intelligenz, zu beantworten [98].

Anhang A

Struktur der DNA

Der DNA-Einzelstrang (Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure) besteht aus einem Rückgrat aus Phosphatgruppe und Zuckermolekül (Desoxyribose). An der Desoxyribose befindet sich eine Base. Die Einheit aus diesen drei Komponenten bezeichnet man als Nukleotid. In der DNA kommen die Zwei-Ring Purin-Basen Adenin (A) und Guanin (G), sowie die Ein-Ring Pyrimidin-Basen Cytosin (C) und Thymin (T) vor. Durch Bildung von sogenannten Watson-Crick-Basenpaaren lagern sich zwei DNA-Einzelstränge antiparallel zu einem Doppelstrang aneinander (Durchmesser ca. 2 nm). Dabei bilden die komplementären Basen Adenin und Thymin zwei Wasserstoffbrückenbindungen aus ($A = T$) und die Basen Guanin und Cytosin bilden drei Wasserstoffbrückenbindungen aus ($G \equiv C$) [59]. Abbildung A.1 zeigt einen Abschnitt einer DNA-Doppelhelix. Die Basen im Inneren sind planar gestapelt und das DNA-Rückgrat ist negativ geladen. Entsprechend der Sequenz der Basen weist die DNA unterschiedliche Stabilität in Form von Schmelztemperatur oder Trennkräften im Einzelmolekülexperiment auf. Die RNA (Ribonucleic acid) besitzt in ihrem Rückgrat das Zuckermolekül Ribose anstatt Desoxyribose und die Base Uracil anstatt Thymin.

Im Kern einer humanen diploiden Zelle befindet sich ca. 2 m doppelsträngige DNA bestehend aus $6,4 \cdot 10^9$ Nukleotidpaaren verteilt auf 46 Chromosomen. Davon sind 22 Paare homologe Autosomen und 2 Gonosomen. In Intervallen von 200 Nukleotiden ist die DNA um ein Histon gewickelt und bildet so ein Nukleosom. Diese perlschnurartige Struktur verdrillt sich zu einer 30 nm dicken Chromatinfaser [59]. Zur Replikation und Transkription muss die Struktur der Nukleosomen geöffnet werden.

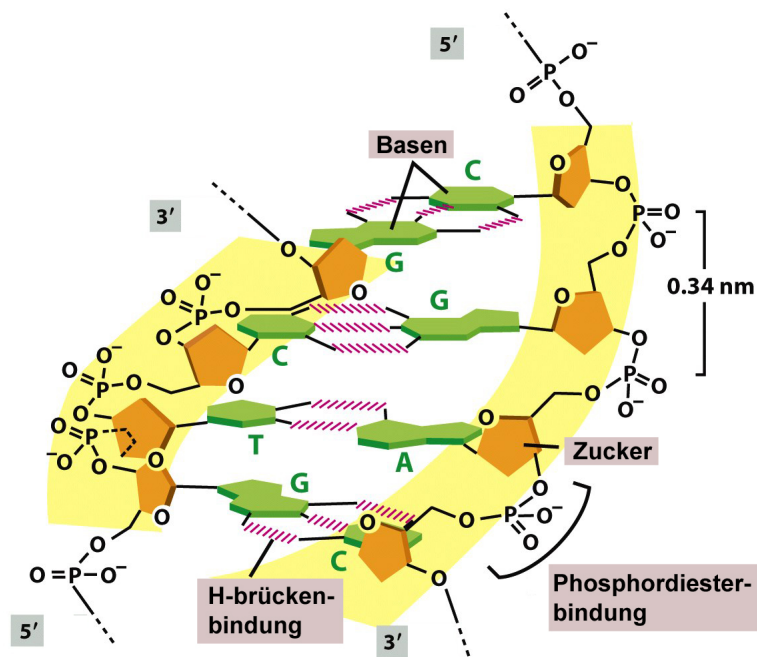


Abbildung A.1: Struktur der DNA. Das negativ geladene Rückgrat besteht aus dem Zucker Desoxyribose und Phosphat. Die Basenpaare (A = T) und (G \equiv C) sind im Inneren planar gestapelt. Aus Alberts et al. [59].

Anhang B

Protokolle zur Oberflächenfunktionalisierung und Anbindungschemie

B.1 Epoxy-Silanisierung

Protokoll zur Silanisierung von Si_3N_4 Cantilevern für AFM Messungen oder PDMS-Stempeln für MFB Messungen.

- Die Cantilever werden zunächst für 10 *min* mit UV-Licht im Ozon-Ofen aktiviert.
- Setze H_2SO_4 Lösung an: 15,3 μl H_2SO_4 in 100 *ml* H_2O .
- Mische 919 μl Epoxysilan (3-Glycidoxypropyl-trimethoxysilane) mit 394 μl H_2SO_4 -Lösung und lasse es 30 *min* rühren (Rührfisch).
- Gebe danach 25 *ml* Isopropanol dazu (leicht schütteln).
- Inkubiere die Cantilever (oder PDMS-Stempel) darin für 20 *min*.
- Dann Cantilever (oder PDMS-Stempel) in Isopropanol schwenken und in H_2O schwenken.
- Eventuell Cantilever 10 *min* bei 80 °C im Ofen trocknen.

Zur Herstellung größerer Mengen kann man zum Beispiel folgende Verhältnisse abmessen: 7 *ml* Epoxysilan + 3 *ml* H_2SO_4 -Lösung in 190 *ml* Isopropanol. Zur Anfertigung der PDMS-stempel sei auf die Arbeiten von Albrecht et al. [58, 49, 48] verwiesen. Cantilever vom Typ MLCT-AUHW von Veeco Instruments Inc.

B.2 Aufschmelzen von Di-Amino-PEG und Umfunktionalisierung zu *COOH*

Im Folgenden ist das Aufschmelzen von *Di-NH₂-PEG* auf Epoxy-Silan und Umfunktionalisierung zu *COOH* beschrieben.

Verfahren für zwei Glasobjektträger (Slides):

- PEG (Polyethylenglykol) aus Gefrierfach nehmen und vor dem Öffnen auf Raumtemperatur erwärmen lassen.
- Ofen auf 78 °C einstellen.
- Glaspetrischale mit Isopropanol auswischen und mit *H₂O* nachspülen.
- Pinzetten in *H₂SO₄* reinigen.
- Zwei Epoxy-Silan-Slides in größere Schale nebeneinander legen. Dose nach entnahme wieder mit Argon befüllen.
- Oben rechts Nummern zu Beschriftung und Kenntlichmachung der Orientierung einritzen.
- 80 mg *Di-NH₂-PEG* (MW 3000 g/mol) Pulver abwiegen und auf ein Slide gleichmäßig aufstreuen.
- 15 min in Ofen legen und Pulver schmelzen (78 °C, abgedeckte Petrischale).
- Oberseite des zweiten Slides auf das Erste legen.
- Geschmolzenes PEG etwas verreiben (Slides aufeinander) und bei 78 °C für 24 h im Ofen lassen.
- **Nächster Tag:** Glasbox mit Slide-Ständer mit erhitztem *H₂O* befüllen.
- Slides aus Ofen nehmen und vor dem Erkalten trennen und ins Wasserbad geben.
- Slides ausgiebig in heissem *H₂O* schwenken und unter fließendem *H₂O* abspülen (im Ständer).
- Mit *N₂* trocknen. Es ist nun eine Lagerung unter Argon bis zur Umfunktionalisierung im nächsten Schritt möglich.

B.2 Aufschmelzen von Di-Amino-PEG und Umfunktionalisierung zu *COOH* 57

Umfunktionalisierung zu *COOH*. Starte 16.00 h. Wegen Verwendung reizender Substanzen und organischer Lösungsmittel (giftig, Gefahrensymbol T) muss im Luft-Abzug gearbeitet werden! Außerdem sind Schutzbrille, Schutzkittel und Handschuhe unbedingt erforderlich!

- 500 mg Glutarsäureanhydrid in dunkles Glasröhrchen abwiegen und in 250 μ l Dimethylformamid (DMF, H_2O frei, 99,8 %) lösen. Das DMF wird dabei mit Spritze und Kanüle aufgezogen und gleichzeitig das entnommene Volumen in der DMF Flasche mit Argon aufgefüllt (Argon-gefüllter Ballon und Kanüle).
- Ränder einer Metallbox mit DMF (mit H_2O) befüllen (Pasteurpipette) und mit Deckel schließen, um DMF Atmosphäre zu schaffen.
- 200 μ l Glutarsäureanhydrid+DMF Lösung mit Pasteurpipette auf ein Slide geben (am Rand) und zweites Slide darauf kippen. Die Lösung soll ohne Luftblasen gleichmäßig zwischen den Slides verteilt sein.
- In Glaspetrischale in erhöhter Position (3 Slides untergelegt) und geschlossener Metallbox unter DMF Atmosphäre für 17 Stunden belassen.
- **Nächster Tag:** Nach 17 Stunden (9.00 h) Slides auseinander ziehen.
- Mit DMF 5x spülen. Dazu Pasteurpipette verwenden und DMF am Slide (schräg gehalten) in die Metallbox ablaufen lassen (im Abzug).
- Unter fließend H_2O spülen
- Mit N_2 trockenblasen.
- Slide kann nun unter Argon gelagert werden.

Bei AFM-Cantilevern erfolgt das PEG-Aufschmelzen und das Umfunktionalisieren bis auf kleine Änderungen entsprechend:

- Die Cantilever müssen zunächst Silanisiert werden (Anhang [B.1](#)).
- Die Cantilever werden in die Schmelzen und Flüssigkeiten gelegt. Dazu verwendet man am besten Teflontigel.
- Hat man den Cantilever aus der PEG-Schmelze genommen, wird er erst in heißem, dann in kaltem H_2O geschwenkt.
- Dann wird der Cantilever in DMF geschwenkt und vorsichtig auf einem Filterpapier trockengetupft.
- Anschließend wird er in die DMF/Glutarsäureanhydrid-Lösung gegeben.
- Danach wird er wieder vorsichtig in DMF geschwenkt.

Im AFM-Experiment wurde PEG mit einem Molekulargewicht von $MW = 6000 \text{ g/mol}$ auf Cantilever und Slide angebunden. Da das PEG-Monomer ein Molekulargewicht von $MW = 44 \text{ g/mol}$ besitzt, entspricht das PEG-6000 einer Länge von 136 Monomeren. Die Epoxy-Silan-funktionalisierten Objektträger werden von Schott-Nexterion bezogen.

B.3 Anbindung von kurzen DNA-Oligomeren

Nach der Beschichtung von Objektträger und Cantilever oder Silikonstempel mit Polyethylenglykol-Polymeren (Anhang B.2) können darauf die DNA-Oligos angebunden werden:

- **Anbindung Oligo A:** Das mit COOH -PEG beschichtete Slide wird für 1 h in Borat Puffer inkubiert um nach der Umfunktionalisierung verbliebene NH_3^+ Gruppen zu deprotonieren. Dies verringert unspezifische Wechselwirkungen.
- Anschließend mit H_2O waschen und mit N_2 trocknen.
- Es erfolgt eine Voraktivierung mittels EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) und NHS (N-hydroxysuccinimide). Löse dazu 100 mM EDC und 100 mM NHS jeweils getrennt in H_2O und mische beide Lösungen 1:1. Das Slide wird für 15 min darin inkubiert.
- Waschen mit H_2O und trocknen.
- Es wird 50 mM EDC in MES Puffer gelöst.
- Die DNA Stammlösung wird in diesem MES/EDC Puffer verdünnt angesetzt (z.B. 50 μM Oligokonzentration). Die DNA-Oligomere sind an einem Ende mit einer Hydrazid-Gruppe funktionalisiert, über die sie an die COOH -Gruppe des PEG angebunden werden. Es wird ca. 1,5 μl Oligolösung je Spot auf dem Slide für MFB-Experimente benötigt.
- Die Oligolösung verbleibt für 30 min auf dem Slide.
- Dann werden die Spots abgesaugt (nur bei Slide möglich).
- Das Slide wird in H_2O kurz geschwenkt und unter fließend H_2O gespült.
- Blocken in Tris Puffer für 15 min.
- Mit H_2O waschen und N_2 trocknen.
- **Hybridisierung mit Oligo B:** Es werden 5 μl des Oligos B (komplementär zu A) in 5 ml 5x SSC verdünnt.
- Das Slide wird darin 30 min unter Lichtabschluss inkubiert.

- Anschließend wird es in 0,2x SSC + 5 ppm Tween Waschlösung geschwenkt.
- Dann wird es vorsichtig mit N_2 getrocknet.

Für Experimente mit der molekularen Kraftwaage (MFB) wird ein dritter Oligo C direkt in der selben Lösung mit Oligo B verdünnt und hybridisiert.

Zur Ermittlung der Kopplungseffizienz der im MFB verwendeten Biotin-funktionalisierten Oligos wird zusätzlich 30 *min* in einer Lösung von 1 $\mu g/ml$ Streptavidin-Alexa-Fluor (AF) in 1x PBS und 0,4 % BSA inkubiert. Anschließend wird in 0,2xSSC gewaschen und mit N_2 getrocknet.

Zur Auswertung der Fluoreszenz dient der Tecan Laserscanner. Es wird die Anregung und Emission von Cy3 (543/590 *nm*) und AF (633/670 *nm*) verwendet (Auflösung: 4 μm).

Beispiele von Sequenzen der verwendeten DNA-Oligomere. Die linke Spalte der Tabellen enthält die interne Bezeichnung sowie die dargestellte Orientierung (3' oder 5').

CA29 5'	Hyd-tttttttttttttttttt TAGCTATTCGAACTATAGCTTAAGGACGTC
CA21 3'	cy3-tttttGACGTCCTTAAGCTATAGTTCGAATAGCTActtttttttttttttttc ATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGC

CA94 5'	GACGTCCTTAAGCTATAGTTCGAATAGCTAtttttttttt-Hyd
CA95 3'	Hyd-ttttttttttCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGAT

CA55 5'	Hyd-ttttttttttttttttttCTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGAT
CA56 3'	GACGTCCTTAAGCTATAGTTCGAATAGCTAtttttttttttttttttt-Hyd

CA134 3'	NH2-10t-CTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGAT
CA118 5'	GACGTCCTTAAGCTATAGTTCGAATAGCTAc-8t-Cy3-8t-cATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAG
CA62 3'	TAGCTATTCGAACTATAGCTTAAGGACGTC-10t-Bio

Tabelle B.4: Oligosequenz zur MFB-Messung.

Für weitere Sequenzen siehe [50]. Die Oligomere wurden bezogen von IBA GmbH.

B.5 Immobilisierung von λ -DNA

Bei der DNA-Analyse mittels Gel-Elektrophorese dient λ -DNA BstE II digest (Konzentration: $863 \mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich GmbH) als Molekulargewichts-Marker. Sie wird in Lösungen mit 14 Fragmenten von 117 bis 8454 Basenpaaren (bp) ausgeliefert.

Für die AFM-Messung wird die λ -DNA mit TEN Puffer 1 : 6 verdünnt. Ein Tropfen dieser Lösung ($50 \mu\text{l}$) wird dann auf einem Gold-beschichteten Objektträger eingetrocknet. Das AFM-Experiment wird unter TEN Puffer mit einem unbehandelten Si_3N_4 Cantilever durchgeführt.

B.6 Puffer

Pufferlösungen, die für Experimente und Oberflächenchemie nötig sind:

BORAT: 250 mM Borsäure, pH 9,0

MES: 100 mM (2)-Morpholinoethansulfonsäure, 200 mM NaCl, pH 5,5

PBS: 10 mM Phosphatpuffer, $2,7 \text{ mM}$ KCl, 137 mM NaCl, pH 7,4

SSC: 1x, (5x) Natrium Citrat (Standard Sodium Citrat), 150 mM NaCl in 1x SSC, pH 7,0

TEN: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8,0

TRIS: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 7,2

Waschlösung: 0,2x SSC + 5 ppm Tween

H_2O : Millipore-Anlage

Die Chemikalien sind von Sigma-Aldrich GmbH bezogen.

B.7 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die *Escherichia coli* Bakterien werden auf einer Trypticase Soy Agar-Platte (TSA, Difco) mit $50 \mu\text{l}$ Carbenicillin (Sigma-Aldrich) bei 37°C kultiviert. Die Zellen werden von der Nährplatte vorsichtig abgeerntet und in $150 \mu\text{l}$ PBS suspensiert und 2 min bei 2500 U/min zentrifugiert. Der Überstand, welcher eventuell noch Spuren des Nährgels enthält, wird herausgenommen und die Zellen in frischem PBS resuspensiert.

B.8 Vorbereitung und Durchführung von Messungen an *Escherichia coli*

- **Amino-Silanisierung:** Die Si_3N_4 Cantilever werden gereinigt und 10 min bei 80 °C in purem Aminosilan ($N1 - [3 - (Trimethoxisilyl) - propyl - diethylenetriamine]$) inkubiert. Anschließend werden sie in Ethanol geschwenkt und für 1 h bei 80 °C im Ofen belassen.
- Auf das Aminosilan wird Carboxymethylamylose (CMA) per EDC/NHS Aktivierung angebunden.
- Amino-Galabiose wird auf die aktivierte CMA angebunden.
- Eine entsprechende CMA Beschichtung wird auf Deckgläsern durchgeführt die in gebohrte Petri-Schalen eingeklebt wurden, um die optische Darstellung der *E. coli* Zellen zu erlauben.
- Ein Tropfen Zellsuspension wird auf das reaktivierte Deckglas gegeben. Die Aminogruppen der *E. coli* Zellen binden somit an die Carboxygruppen der CMA.
- Nach Spülen mit PBS erfolgt das AFM Experiment.
- Lösliche Galabiose kann zum Blocken der spezifischen Bindung PapG-Galabiose verwendet werden (Kontrollexperiment).

Anhang C

Polymermodelle

C.1 Das Freely-Jointed Chain (FJC) Modell

Das FJC (frei verbundene Kette) Modell beschreibt ein Polymer als Kette von N starren und gleich langen Segmenten l_k , auch Kuhnlänge genannt, die drehbar aneinandergelockt sind. Die Bindungswinkel zwischen den Segmenten sind dabei gleichwahrscheinlich. Der mittlere End-zu-End Abstand $R(F)$, also die Länge des Polymers in Abhängigkeit der angelegten Kraft F ist gegeben durch

$$R(F) = L_c \cdot \left(\coth \left(\frac{F \cdot l_k}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{F \cdot l_k} \right) \quad (\text{C.1})$$

Mit Hilfe der Langevinfunktion

$$\mathcal{L}(x) = \coth(x) - \frac{1}{x} \quad (\text{C.2})$$

lässt sich schreiben:

$$R(F) = L_c \cdot \mathcal{L} \left(\frac{F \cdot l_k}{k_B T} \right) \quad (\text{C.3})$$

Mit \mathcal{L}^* , der Umkehrfunktion von \mathcal{L} erhält man als Näherungsformel für große N die Kraft in Abhängigkeit der Dehnung

$$F(R) = \frac{k_B T}{l_k} \cdot \mathcal{L}^* \left(\frac{R}{L_c} \right) \quad (\text{C.4})$$

Dabei ist $L_c = N \cdot l$ die maximale Konturlänge bestehend aus N Segmenten der Länge l_k , k_B die Boltzmannkonstante und T die Temperatur [41, 99, 100]. Die Kuhnlänge l_k der Segmente ist dabei nicht mit der einzelnen chemischen Bindungslänge gleichzusetzen sondern sie ist meist größer. Die Kuhnlänge l_k und die Anzahl der Segmente N sind die Fitparameter. Das Modell beschreibt zum Beispiel die Streckung von Polyethylenglycol (PEG, $l_k = 0,7 \text{ nm}$) [99]. Andere Modelle und Weiterentwicklungen sind das FRC (freely rotating chain) Modell [100, 101, 102] und das EJC (elastically jointed chain) Modell [103].

C.2 Das Worm-Like Chain (WLC) Modell

Das WLC (wurmartige Kette) Modell beschreibt ein Polymer als kontinuierliche Struktur mit konstantem Biegemodul. Als Näherungsformel wird die Kraft in Abhängigkeit der Dehnung beschrieben durch

$$F(r) = \frac{k_B T}{b} \cdot \left(\frac{1}{4} \cdot \left(1 - \frac{r}{L_c} \right)^{-2} + \frac{r}{L_c} - \frac{1}{4} \right) \quad (\text{C.5})$$

Dabei ist $F(r)$ die Kraft in Abhängigkeit der Dehnung r , b die Persistenzlänge und L_c die Konturlänge [104, 105, 43]. Die Persistenzlänge b beschreibt den Abstand zweier Punkte deren Tangenten nicht mehr korrelieren. Die Persistenzlänge b und die Konturlänge L_c stellen die Fitparameter dar. Dieses Modell kann zur Beschreibung der Streckung von λ -DNA oder Entfaltung der Ig-Domänen von Titin ($b = 0,4 \text{ nm}$) verwendet werden [104, 105, 43].

C.3 Entropische und enthalpische Elastizität

Elastische Verformungen des Polymers werden im FJC Modell nicht berücksichtigt. Es beschreibt deshalb nur die entropische Elastizität. Im WLC Modell werden Einschränkungen im Konformationsraum durch das Biegemodul berücksichtigt. In beiden Modellen kann jedoch die maximale Länge des Polymers als Summe der einzelnen Segmente nicht überschritten werden. Bei der Berücksichtigung der enthalpischen Dehnung der Bindungswinkel und -abstände, ergeben sich zusätzliche Terme hookscher Elastizität. Für das FJC Modell ergibt sich aus Gleichung C.3:

$$R(F) = L_c \cdot \mathcal{L} \left(\frac{F \cdot l_k}{k_B T} \right) + \frac{N}{k} \cdot F \quad (\text{C.6})$$

Dabei ist k die Federkonstante eines Segments [41]. Für das WLC Modell ergibt sich aus Gleichung C.5:

$$F(r) = \frac{k_B T}{b} \cdot \left(\frac{1}{4} \cdot \left(1 - \frac{r}{L_c} + \frac{F}{k_0} \right)^{-2} + \frac{r}{L_c} - \frac{1}{4} - \frac{F}{k_0} \right) \quad (\text{C.7})$$

Dabei ist k_0 die normalisierte Federkonstante [100]. Für die üblicherweise im AFM betrachteten Kraftbereiche sind diese Erweiterungen von untergeordneter Bedeutung.

Anhang D

Software

Zur Datenaufzeichnung- und auswertung und für Simulationen wurde die Software „Igor Pro“ von WaveMetrics Inc. sowie die „MFP-1D“ Prozeduren und Makros von Asylum Research Inc. verwendet.

Dieses Dokument wurde mit L^AT_EX gesetzt.

Literaturverzeichnis

- [1] R. Phillips, S. R. Quake, The biological frontier of physics, *Physics Today* 59 (5) (2006) 38–43.
- [2] R. P. Feynman, There's plenty of room at the bottom, *Journal of Microelectromechanical Systems* 1 (1) (1992) 60–66.
- [3] F. Ritort, Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications, *Journal of Physics-Condensed Matter* 18 (32) (2006) R531–R583.
- [4] E. M. Purcell, Life at low reynolds number, *American Journal of Physics* 45 (1) (1977) 3–11.
- [5] A. Einstein, Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, *Annalen Der Physik* 17 (1) (1905) 549–560.
- [6] A. Einstein, The theory of the brownian motion, *Annalen Der Physik* 19 (2) (1906) 371–381.
- [7] A. Einstein, Theoretical remarks on the brownian motion, *Zeitschrift Fur Elektrochemie Und Angewandte Physikalische Chemie* 13 (1907) 41–42.
- [8] M. v. Smoluchowski, Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen, *Annalen Der Physik* 21 (1906) 756–780.
- [9] E. Frey, K. Kroy, Brownian motion: a paradigm of soft matter and biological physics, *Annalen Der Physik* 14 (1-3) (2005) 20–50.
- [10] W. Jansen, Die Erklärung der Brownschen Bewegung durch Einstein, Smoluchowski und Perrin, *Chemkon* 12 (4) (2005) 174–179.
- [11] P. Hanggi, G. Schmid, I. Goychuk, Statistical physics of biocomplexity, *Nova Acta Leopoldina* 88 (332) (2003) 17–33.
- [12] P. Hanggi, F. Marchesoni, F. Nori, Brownian motors, *Annalen Der Physik* 14 (1-3) (2005) 51–70.

- [13] S. K. Kufer, E. M. Puchner, H. Gump, T. Liedl, H. E. Gaub, Single-molecule cut-and-paste surface assembly, *Science* 319 (5863) (2008) 594–596.
- [14] W. E. G. Mueller, M. Rothenberger, A. Boreiko, W. Tremel, A. Reiber, H. Schroder, Formation of siliceous spicules in the marine demosponge *suberites domuncula*, *Cell and Tissue Research* 321 (2) (2005) 285–297.
- [15] G. Binnig, C. F. Quate, C. Gerber, Atomic force microscope, *Physical Review Letters* 56 (9) (1986) 930–933.
- [16] G. Tsiavaliaris, D. J. Manstein, TIRF-Mikroskopie und ihre Anwendung in der Biologie, *BioSpektrum* 5 (2003) 596–600.
- [17] T. A. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S. W. Hell, Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (15) (2000) 8206–8210.
- [18] R. A. Lugmaier, T. Hugel, M. Benoit, H. E. Gaub, Phase contrast and DIC illumination for AFM hybrids, *Ultramicroscopy* 104 (3) (2005) 255–260.
- [19] E. L. Florin, V. T. Moy, H. E. Gaub, Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs, *Science* 264 (5157) (1994) 415–417.
- [20] M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, H. E. Gaub, Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy, *Science* 275 (1997) 1295–1297.
- [21] L. Bergmann, C. Schaefer, H. Niedrig, *Lehrbuch der Experimentalphysik*, Bd. 3, Optik, Walter de Gruyter, Berlin, Germany, 1993.
- [22] M. W. Davidson, M. Abramowitz, *Optical Microscopy*, review Edition, Olympus America Inc., 1999.
- [23] M. Abramowitz, *Microscope - Basics and Beyond*, revised Edition, Vol. 1 of Basics and Beyond Series, Olympus America Inc., 2003.
- [24] J. W. Lichtman, J. A. Conchello, Fluorescence microscopy, *Nat Methods* 2 (12) (2005) 910–919.
- [25] R. Y. Tsien, The green fluorescent protein, *Annual Review of Biochemistry* 67 (1998) 509–544.
- [26] R. Heim, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, Improved green fluorescence, *Nature* 373 (1995) 663–664.
- [27] R. Heim, R. Y. Tsien, Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelength and fluorescence resonance energy transfer, *Current Biology* 6 (2) (1996) 178–182.

- [28] M. Benoit, T. Holstein, H. E. Gaub, Lateral forces in afm imaging and immobilization of cells and organelles, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 26 (4) (1997) 283–290.
- [29] T. Bretschneider, S. Diez, K. Anderson, J. Heuser, M. Clarke, A. Muller-Taubenberger, J. Kohler, G. Gerisch, Dynamic actin patterns and arp2/3 assembly at the substrate-attached surface of motile cells, *Current Biology* 14 (2004) 1–10.
- [30] N. Schneider, I. Weber, J. Faix, J. Prassler, A. Muller-Taubenberger, J. Kohler, E. Burghardt, G. Gerisch, G. Marriott, A lim protein involved in the progression of cytokinesis and regulation of the mitotic spindle, *Cell Motility and the Cytoskeleton* 56 (2003) 130–139.
- [31] D. J. Manstein, in vitro-Motilitätsversuche, *BioSpektrum* 6 (2006) 632–634.
- [32] E. Hecht, *Optics*, 2nd Edition, Addison-Wesley, Massachusetts, USA, 1990.
- [33] F. Zernike, Phase contrast, a new method for microscopic observation of transparent objects. part i, *Physica* 9 (1942) 686–698.
- [34] F. Zernike, Phase contrast, a new method for microscopic observation of transparent objects. part ii, *Physica* 9 (1942) 974–986.
- [35] K. Michel, Die Darstellung von Chromosomen mittels des Phasenkontrastverfahrens, *Die Naturwissenschaften* 29 (1941) 61–62.
- [36] M. Jaschke, H. J. Butt, Height calibration of optical lever atomic force microscopes by simple laser interferometry, *Rev. Sci. Instrum.* 66 (2) (1995) 1258–1259.
- [37] R. Krautbauer, DNA Einzelmolekül-Mechanik, Ph.D. thesis, Ludwig-Maximilians-University (2002).
- [38] J. L. Hutter, J. Bechhoefer, Calibration of atomic-force microscope tips, *Rev. Sci. Instrum.* 64 (1993) 1868–1873.
- [39] E.-L. Florin, M. Rief, H. Lehmann, M. Ludwig, C. Dornmair, V. T. Moy, H. E. Gaub, Sensing specific molecular interactions with the atomic force microscope, *Biosensors And Bioelectronics* 10 (1995) 895–901.
- [40] H. J. Butt, M. Jaschke, Calculation of thermal noise in atomic force microscopy, *Nanotechnology* 6 (1995) 1–7.
- [41] M. Rief, Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen, Ph.D. thesis, Ludwig-Maximilians-University (1997).
- [42] F. Kuhner, R. A. Lugmaier, S. Mihatsch, H. E. Gaub, Print your atomic force microscope, *Review of Scientific Instruments* 78 (7) (2007) 0751051–0751055.

- [43] M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, H. E. Gaub, Reversible unfolding of individual titin ig-domains by afm, *Science* 276 (1997) 1109–1112.
- [44] M. Rief, H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub, Sequence dependent mechanics of single dna-molecules, *Nature Struct. Biol.* 6 (4) (1999) 346–349.
- [45] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf, H. E. Gaub, Mechanical stability of single dna molecules, *Biophysical Journal* 78 (4) (2000) 1997–2007.
- [46] H. Dietz, M. Rief, Exploring the energy landscape of gfp by single-molecule mechanical experiments, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (46) (2004) 16192–16197.
- [47] I. Schwaiger, M. Schleicher, A. A. Noegel, M. Rief, The folding pathway of a fast-folding immunoglobulin domain revealed by single-molecule mechanical experiments, *Embo Reports* 6 (1) (2005) 46–51.
- [48] C. Albrecht, K. Blank, M. Lalic-Multhaler, S. Hirler, T. Mai, I. Gilbert, S. Schiffmann, T. Bayer, H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub, Dna: a programmable force sensor, *Science* 301 (5631) (2003) 367–70.
- [49] C. Albrecht, H. Clausen-Schaumann, H. E. Gaub, Differential analysis of biomolecular rupture forces, *Journal of Physics: Condensed Matter* 18 (2006) 1–19.
- [50] C. Albrecht, G. Neuert, R. A. Lugmaier, H. E. Gaub, Molecular force balance measurements reveal that dsdna unbinds under force in rate dependent pathways, *Biophysical Journal* 94 (12).
- [51] J. Leckband, D. Israelachvili, Intermolecular forces in biology, *Quarterly Reviews of Biophysics* 34 (2) (2001) 105–267.
- [52] J. Raedler, E. Sackmann, Imaging optical thickness and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces, *Journal de Physique II* 3 (1993) 727–748.
- [53] G. Wiegand, K. Neumaier, E. Sackmann, Microinterferometry: three-dimensional reconstruction of surface microtopography for thin-film and wetting studies by reflection interference contrast microscopy (ricm), *Applied Optics* 37 (29) (1998) 6892–6905.
- [54] T. Strunz, K. Oroszlan, R. Schafer, H. J. Guntherodt, Dynamic force spectroscopy of single dna molecules, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (20) (1999) 11277–11282.
- [55] C. Friedsam, A. K. Wehle, F. Kuhner, H. E. Gaub, Dynamic single-molecule force spectroscopy: bond rupture analysis with variable spacer length, *Journal of Physics-Condensed Matter* 15 (18) (2003) S1709–S1723.
- [56] F. Kuhner, Dissoziations- und Konformationseigenschaften von Biomolekülen unter Krafteinfluss, Ph.D. thesis, Ludwig-Maximilians-University (2006).

- [57] F. Kuhner, H. E. Gaub, Modelling cantilever-based force spectroscopy with polymers, *Polymer* 47 (7) (2006) 2555–2563.
- [58] C. Albrecht, Die molekulare Kraftwaage, Ph.D. thesis, Ludwig-Maximilians-University (2007).
- [59] B. Alberts, A. Johnson, P. Walter, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, *Molecular Biology of the Cell*, 5th Edition, Taylor and Francis, 2008.
- [60] E. Evans, Probing the relation between force-lifetime- and chemistry in single molecular bonds, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30 (2001) 105–128.
- [61] P. Hanggi, P. Talkner, M. Borkovec, Reaction-rate theory - 50 years after kramers, *Reviews of Modern Physics* 62 (2) (1990) 251–341.
- [62] E. Evans, K. Ritchie, Dynamic strength of molecular adhesion bonds, *Biophysical Journal* 72 (4) (1997) 1541–1555.
- [63] E. Evans, K. Ritchie, Strength of a weak bond connecting flexible polymer chains, *Biophysical Journal* 76 (5) (1999) 2439–2447.
- [64] C. Friedsam, Elektromanipulation einzelner Polyelektrolytmoleküle, Ph.D. thesis, Ludwig-Maximilians-University (2003).
- [65] S. B. Smith, Y. Cui, C. Bustamante, Overstretching b-dna: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded dna molecules, *Science* 271 (5250) (1996) 795–9.
- [66] C. Bustamante, S. B. Smith, J. Liphardt, D. Smith, Single-molecule studies of dna mechanics, *Current Opinion in Structural Biology* 10 (2000) 279–285.
- [67] J. Morfill, F. Kuhner, K. Blank, R. A. Lugmaier, J. Sedlmair, H. E. Gaub, B-s transition in short oligonucleotides, *Biophysical Journal* 93 (7) (2007) 2400–2409.
- [68] K. Breslauer, R. Frank, H. Blocker, L. Marky, Predicting dna duplex stability from the base sequence., *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (11) (1986) 3746–3750.
- [69] J. SantaLucia, J., A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide dna nearest-neighbor thermodynamics, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (4) (1998) 1460.
- [70] R. Merkel, P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, E. Evans, Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy, *Nature* 397 (6714) (1999) 50–3.
- [71] A. Lebrun, R. Lavery, Modelling extreme stretching of dna, *Nucleic Acids Res* 24 (12) (1996) 2260–7.

- [72] R. Lavery, A. Lebrun, Modelling dna stretching for physics and biology, *Genetica* 106 (1-2) (1999) 75–84.
- [73] G. Altan-Bonnet, A. Libchaber, O. Krichevsky, Bubble dynamics in double-stranded dna, *Phys Rev Lett* 90 (13) (2003) 138101.
- [74] I. G. Bell, Models for the specific adhesion of cells to cells, *Science* 200 (4342) (1978) 618–627.
- [75] H. A. Kramers, Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions, *Physica* 7 (1940) 284–304.
- [76] A. V. Fotin, A. L. Drobyshev, D. Y. Proudnikov, A. N. Perov, A. D. Mirzabekov, Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips, *Nucleic Acids Research* 26 (6) (1998) 1515–1521.
- [77] S. R. Gill, M. Pop, R. T. DeBoy, P. B. Eckburg, P. J. Turnbaugh, B. S. Samuel, J. I. Gordon, D. A. Relman, C. M. Fraser-Liggett, K. E. Nelson, Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome, *Science* 312 (5778) (2006) 1355–1359.
- [78] T. A. Russo, J. R. Johnson, Medical and economic impact of extraintestinal infections due to escherichia coli: focus on an increasingly important endemic problem, *Microbes and Infection* 5 (2003) 449–456.
- [79] F. P. Lindberg, B. Lund, S. Normark, Genes of pyelonephritogenic escherichia-coli required for digalactoside-specific agglutination of human-cells, *Embo Journal* 3 (5) (1984) 1167–1173.
- [80] E. Bullitt, L. Makowski, Structural polymorphism of bacterial adhesion pili, *Nature* 373 (6510) (1995) 164–167.
- [81] E. Bullitt, C. H. Jones, R. Striker, G. Soto, F. JacobDubuisson, J. Pinkner, M. J. Wick, L. Makowski, S. J. Hultgren, Development of pilus organelle subassemblies in vitro depends on chaperone uncapping of a beta zipper, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (23) (1996) 12890–12895.
- [82] E. Bullitt, L. Makowski, Bacterial adhesion pili are heterologous assemblies of similar subunits, *Biophysical Journal* 74 (1) (1998) 623–632.
- [83] F. G. Sauer, K. Futterer, J. S. Pinkner, K. W. Dodson, S. J. Hultgren, G. Waksman, Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis, *Science* 285 (5430) (1999) 1058–1061.
- [84] E. T. Saulino, S. J. Hultgren, E. Bullitt, Type 1 pili present multiple copies of adhesin at the filament tip, *Biophysical Journal* 80 (1) (2001) 318A–+.

- [85] F. G. Sauer, J. S. Pinkner, G. Waksman, S. J. Hultgren, Chaperone priming of pilus subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation, *Cell* 111 (4) (2002) 543–551.
- [86] X. Q. Mu, E. H. Egelman, E. Bullitt, Structure and function of hib pili from haemophilus influenzae type b, *Journal of Bacteriology* 184 (17) (2002) 4868–4874.
- [87] X. Q. Mu, Z. H. G. Jiang, E. Bullitt, Localization of a critical interface for helical rod formation of bacterial adhesion p-pili, *Journal of Molecular Biology* 346 (1) (2005) 13–20.
- [88] X. Q. Mu, E. Bullitt, Structure and assembly of p-pili: A protruding hinge region used for assembly of a bacterial adhesion filament, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (26) (2006) 9861–9866.
- [89] B. Lund, F. Lindberg, B. I. Marklund, S. Normark, The papg protein is the alpha-d-galactopyranosyl-(1-4)-beta-d-galactopyranose-binding adhesin of uropathogenic escherichia coli, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (16) (1987) 5898–5902.
- [90] J. Ohlsson, J. Jass, B. E. Uhlin, J. Kihlberg, U. J. Nilsson, Discovery of potent inhibitors of papg adhesins from uropathogenic escherichia coli through synthesis and evaluation of galabiose derivatives, *Chembiochem* 3 (8) (2002) 772–779.
- [91] A. Larsson, J. Ohlsson, K. W. Dodson, S. J. Hultgren, U. Nilsson, J. Kihlberg, Quantitative studies of the binding of the class ii papg adhesin from uropathogenic escherichia coli to oligosaccharides, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 11 (10) (2003) 2255–2261.
- [92] R. A. Lugmaier, S. Schedin, F. Kuhner, M. Benoit, Dynamic restacking of escherichia coli p-pili, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 37 (2) (2008) 111–120.
- [93] A. J. Merz, M. So, M. P. Sheetz, Pilus retraction powers bacterial twitching motility, *Nature* 407 (6800) (2000) 98–102.
- [94] A. Touhami, M. H. Jericho, J. M. Boyd, T. J. Beveridge, Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of pseudomonas aeruginosa pili by using atomic force microscopy, *Journal of Bacteriology* 188 (2) (2006) 370–377.
- [95] B. D. Brower-Toland, C. L. Smith, R. C. Yeh, J. T. Lis, C. L. Peterson, M. D. Wang, Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of dna., *PNAS* 99 (4) (2002) 1960–1965.
- [96] W. Mobius, R. A. Neher, U. Gerland, Kinetic accessibility of buried dna sites in nucleosomes, *Physical Review Letters* 97 (20) (2006) 2081021–2081024.

-
- [97] B. D. Strahl, D. Allis, The language of covalent histone modifications, *Nature* 403 (2000) 41–45.
 - [98] R. Cotterill, *Biophysik: Eine Einführung*, 1st Edition, Wiley-VCH, 2007.
 - [99] F. Oesterhelt, M. Rief, H. E. Gaub, Single molecule force spectroscopy by afm indicates helical structure of poly(ethylene-glycol) in water., *New Journal of Physics* 1 (1999) 6.1–6.11.
 - [100] T. Hugel, M. Seitz, The study of molecular interactions by afm force spectroscopy, *Macromol. Rapid Commun.* 22 (13) (2001) 989–1016.
 - [101] T. Hugel, M. Rief, M. Seitz, H. E. Gaub, R. R. Netz, Highly stretched single polymers: Atomic-force-microscope experiments versus ab-initio theory, *Physical Review Letters* 94 (048301) (2005) 1–4.
 - [102] S. X. Cui, C. Albrecht, F. Kuhner, H. E. Gaub, Weakly bound water molecules shorten single-stranded dna, *Journal of the American Chemical Society* 128 (20) (2006) 6636–6639.
 - [103] L. Livadaru, R. R. Netz, H. J. Kreuzer, Stretching response of discrete semiflexible polymers, *Macromolecules* 36 (10) (2003) 3732–3744.
 - [104] J. F. Marko, E. D. Siggia, Stretching dna, *Macromolecules* 28 (26) (1995) 8759–8770.
 - [105] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, S. Smith, Entropic elasticity of lambda-phage dna, *Science* 265 (1994) 1599–1600.

Publikationen

1. **Phase contrast and DIC illumination for AFM hybrids.**
Robert A. Lugmaier, Thorsten Hugel, Martin Benoit und Hermann E. Gaub
Ultramicroscopy 104, 3, 255-260 (2005)
doi:10.1016/j.ultramic.2005.04.008
2. **B-S transition in short oligonucleotides.**
Julia Morfill, Ferdinand Kühner, Kerstin Blank, Robert A. Lugmaier, Julia Sedlmair und Hermann E. Gaub
Biophysical Journal 93, 7, 2400-2409 (2007)
doi:10.1529/biophysj.107.106112
3. **Print your atomic force microscope.**
Ferdinand Kühner, Robert A. Lugmaier, Steffen Mihatsch und Hermann E. Gaub
Review of Scientific Instruments 78, 7, 0751051-0751055 (2007)
doi:10.1063/1.2751099
4. **Dynamic restacking of Escherichia Coli P-pili.**
Robert A. Lugmaier, Staffan Schedin, Ferdinand Kühner und Martin Benoit
European Biophysics Journal with Biophysics Letters 37, 2, 111-120 (2008)
doi:10.1007/s00249-007-0183-x
5. **Molecular force balance measurements reveal that double-stranded DNA unbinds under force in rate-dependent pathways.**
Christian H. Albrecht, Gregor Neuert, Robert A. Lugmaier und Hermann E. Gaub
Biophysical Journal 94, 12, 4766-4774 (2008)
doi:10.1529/biophysj.107.125427

Phase contrast and DIC illumination for AFM hybrids

Robert A. Lugmaier*, Thorsten Hugel, Martin Benoit, Hermann E. Gaub

Lehrstuhl für Angewandte Physik and Center for NanoScience, Ludwig-Maximilians-Universität München, Amalienstrasse 54, D-80799 München, Germany

Received 1 December 2004; received in revised form 21 April 2005; accepted 29 April 2005

Abstract

High-resolution optical microscopy is an essential pre-requisite for life science force microscopy, particularly for applications in cell biology and medicine. Identification and validation of cells is typically established with techniques like phase contrast microscopy or differential interference contrast microscopy. The option to select or monitor individual cells online with such light microscopy techniques while performing atomic force microscopy (AFM) measurements is therefore extremely beneficial. Here, we report two conceptually different strategies to implement these light microscopy techniques in a fully functional AFM head at the ultimate resolution of the Abbe diffraction limit. © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

PACS: 87.64.Dz; 87.64.Rr

Keywords: Phase contrast; Differential interference contrast (DIC); Atomic force microscope (AFM); Single-molecule force spectroscopy

1. Introduction

Most approaches to implement high-resolution optical microscopy in a hybrid instrument were hampered by the requirement of atomic force microscopy (AFM) [1–4] to utilize one half space of the experimental volume. Therefore, high-

resolution optics was limited to epi or TIRF illumination [5,6]. In this paper, we integrated in the first approach a LED-based illumination ring into the cantilever holder, replacing the ring diaphragm in the condenser of the conventional phase contrast setup. In the second approach we used the reflecting surface of the AFM cantilever as a mirror to illuminate the sample in a quasi-trans differential interference contrast (DIC) mode from the epi side. The results of both strategies are compared to each other and to the corresponding standard geometries of illumination. Stability and versatility of the setup was demonstrated by

*Corresponding author. Tel.: +49 89 21802306;
fax: +49 89 21802050.

E-mail address: Robert.Lugmaier@physik.uni-muenchen.de (R.A. Lugmaier).

URL: <http://www.biophysik.physik.uni-muenchen.de>.

simultaneous single-molecule force spectroscopy. A thorough discussion of the advantages and of potential future expansions is given.

2. Materials and methods

2.1. Experimental setup

The experimental setup used for the studies described here consists of a home-built AFM stand-alone type placed on top of an inverted optical microscope (Zeiss Axiomat, Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany). This well-proven type of optical microscope was chosen because of its unparalleled mechanical stability. This hybrid instrument was hung from the ceiling of the lab suspended by rubber bungee cords for vibration insulation. The resulting cutoff frequency of 0.4 Hz for the mechanical crosstalk was found to be sufficient to dampen out building vibrations. The stage of the Axiomat was replaced by a massive aluminum plate stiffening the setup against higher frequency pick-up from sound. The system was optimized towards single-molecule force spectroscopy applications and proved to be sufficiently sensitive and stable to resolve single receptor ligand unbinding events between life cell surfaces [7–9].

2.2. Phase contrast illumination by LED ring

The cantilever holder of the AFM was designed such that a ring of 12 surface mount LEDs (Fairchild Semiconductor Inc., South Portland, ME, USA, smLED, QTLP650C-Y, ultra-miniature chip type 1206, AlInGaP technology, continuous forward current $I = 20$ mA, peak wavelength $\lambda = 590$ nm) could be integrated without interfering with the laser beams of the beam bounce cantilever deflection sensor (see Fig. 1a). Therefore, the ring could not be completely closed (see Fig. 1b), resulting in a slight and tolerable anisotropy of the illumination. The direction and the position of the LEDs was chosen such, that they illuminated the sample under the aperture angle window defined by the phase contrast ring Ph#3 of the 100 \times Planapo Oil (N.A. = 1.30)

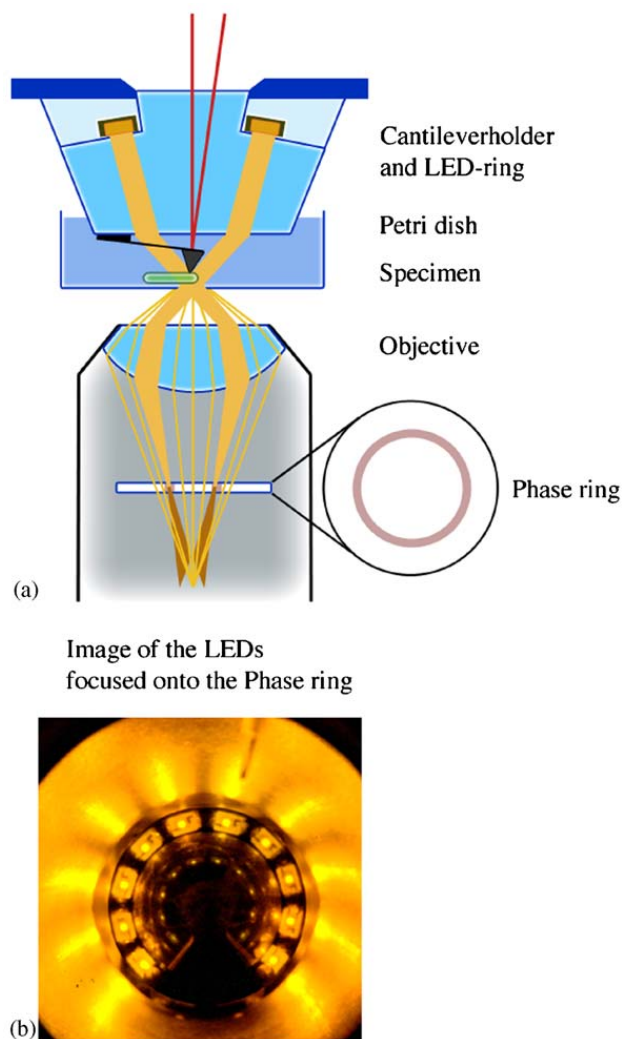


Fig. 1. (a) Ray trace schematics of the LED ring illumination for phase contrast microscopy. (b) Image taken from the rear focal plane of the objective through the Bertrand lens showing the LEDs superimposed with the phase ring.

objective of the Axiomat. The LEDs were soldered together as a ring, open at one side, and installed in the Plexiglass holder, in which a corresponding chamfer was millcut before. Fig. 1b shows the result: all LEDs (bright squares) are focused onto the phase contrast ring (dark circular ring) without spill. Normally, this phase contrast ring in the rear focal plane of the objective is illuminated by Köhler illumination through a ring diaphragm. The invention of the phase contrast microscope by Frits Zernike made it possible to observe thin transparent objects of higher refractive index

(so-called phase objects), invisible by normal bright field illumination, in vivo without changing their characteristics. For a detailed explanation of phase contrast microscopy see Refs. [10–12]. As can be seen in Fig. 1b, the local illumination by LEDs close to the sample fulfils the same purpose, leaving the full upper half space for the AFM.

2.3. Setup for quasi-trans DIC

The setup shown in Fig. 2 is mainly that of an epi DIC alignment used for imaging opaque specimens like semiconductor chips. In contradiction to normal epi DIC we do not examine a structured reflective surface itself but only use a plain reflector to image a specimen in a focal plain right below. The needed constituents in the microscope (polarizer, Nomarski prism, analyzer) for our quasi-trans DIC technique are the same as

needed for standard epi DIC. Although the surfaces of cantilever and cantilever chip facing the microscope objective are not coated with a special metallic layer (the upper side is gold coated for the purpose of laser beam deflection) they are suitable for quasi-trans DIC illumination due to their evenly plain surface qualities (chip: glass; cantilever: silicon nitride). By using the reflective chip of the cantilever as a mirror for the DIC illumination the sample could be illuminated in the full field of view (see Fig. 3a). The end of the cantilever with its tip was then used as a mirror to exactly zoom into the structure to be investigated on the cell by AFM (see Fig. 3b). Thus, the well-known techniques of trans DIC and reflected light DIC microscopy (see Refs. [13–15]) are combined to examine biological specimens in a way that pseudo three-dimensional images (corresponding to the gradient of the refractive index) of transparent samples are obtained.

2.4. Cantilever preparation

Commercially available cantilevers (Veeco Inc., Santa Barbara, CA, USA, #MLCT-AUHW, silicon nitride, back side coating: 15 nm Cr bottom layer, 60 nm Au top layer; front side coating: none) were used. Functionalization for the adhesion measurements was carried out as follows: the untreated cantilever was fully covered with a 50 μ l droplet of poly-L-lysine solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany, P4707, 0.01%, sterile) which was allowed to incubate for 2 h at room temperature. Afterwards the cantilever was rinsed in water and directly installed in the AFM.

2.5. Sample preparation

To explore the full range of optical resolution, we glued a 0.17 mm thick coverglass over a hole punched into the plastic Petri dish used for this study. Human epithelial cells were taken from the inner side of the cheek and directly placed onto the coverglass in the Petri dish. A volume of 2 ml of phosphate-buffered saline (PBS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany) was added. For about 5 min the cells were allowed to settle

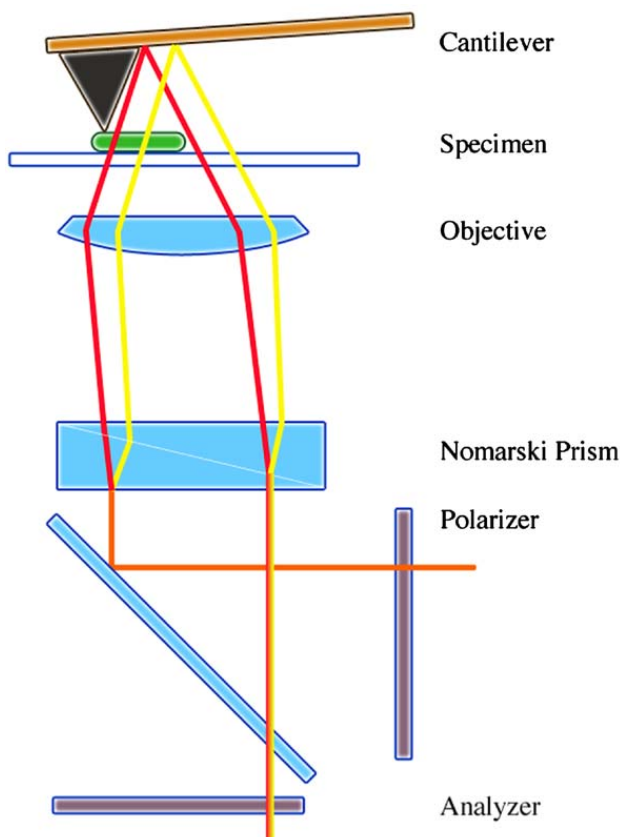


Fig. 2. Ray trace schematics of the quasi-trans differential interference contrast illumination (DIC), using the reflecting AFM cantilever as mirror.

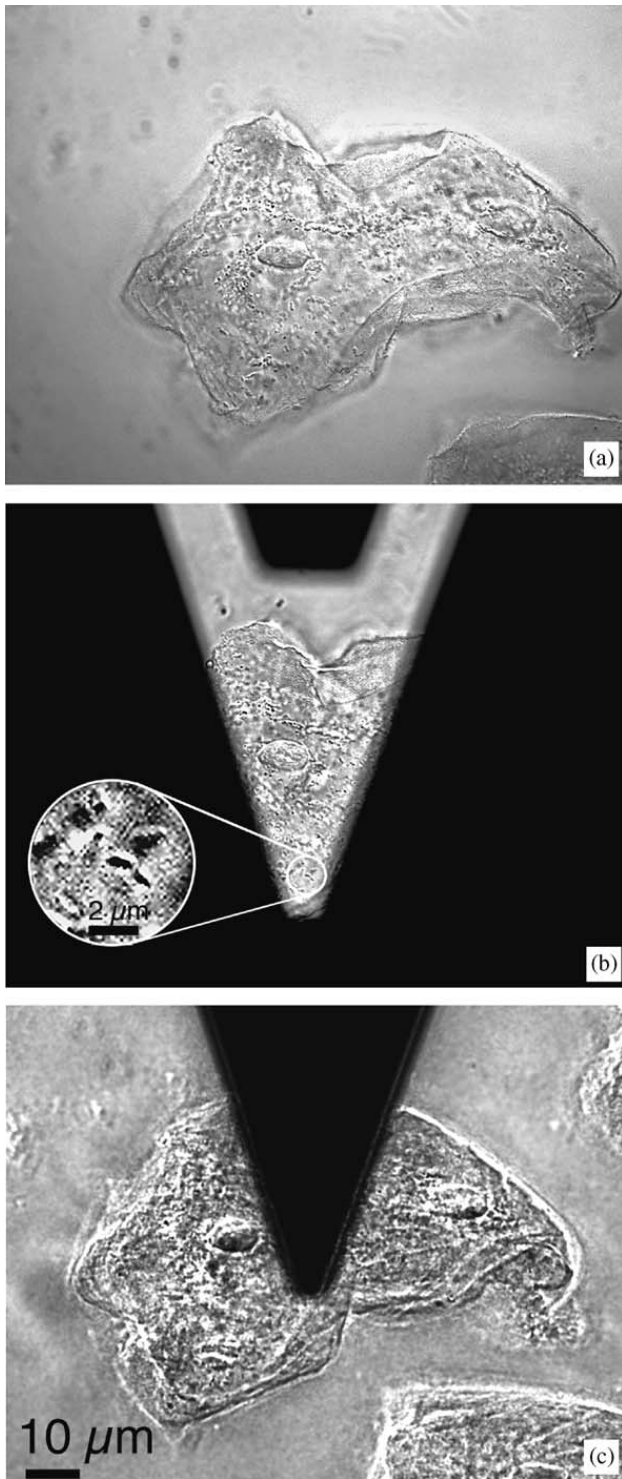


Fig. 3. Micrographs taken in parallel to AFM experiments. (a) Epithelial cell imaged with quasi-trans DIC reflected from the chip. (b) Epithelial cell imaged with quasi-trans DIC reflected from the cantilever. Inset: magnified view of organelles of the epithelial cell. (c) Epithelial cell imaged with LED ring phase contrast.

down and bind to the glass surface. Then we changed the PBS medium again to remove eventually remaining saliva. The so-prepared sample remained intact for at least 2 h of measurement.

3. Experimental results

3.1. Quasi-trans (epi) DIC

Fig. 3a shows two epithelial cells illuminated in quasi-trans DIC mode from the reflecting surface of the cantilever chip. Details of the cellular organization are visible such as the two nuclei and inner organelles like mitochondria and endoplasmic reticulae. Due to the 6° slope at which the cantilever chip is mounted onto the Plexiglass holder, the illumination is slightly anisotropic. However, this only alters the brightness, not the contrast. The quasi-trans DIC illuminated micrograph of the same cells is shown in Fig. 3b with the cantilever as a reflector. Here the cell under the cantilever tip is monitored with optical resolution at the Abbe limit of the objective while an AFM-based experiment, e.g. force spectroscopy, is performed. The identity of the target can be corroborated in this way. In addition, changes, modifications, etc. may be recorded online as they occur. The inset in Fig. 3a displays the magnified section showing micrometer-sized structures, either organelles or bacteria, in or on the epithelial cell. Sub-structures in the dimension of tenths of micrometers are clearly observable and demonstrate the limit of high-resolution optical microscopes. In additional experiments we used fully gold-coated cantilevers and cantilever chips as reflectors for quasi-trans DIC microscopy. The recorded images do not show any significant differences compared to those obtained through reflection at the silicon nitride side. Furthermore, reflection by the silicon nitride surface does not show any phase shifts or interference with beams potentially reflected by other metal layers. The results show that all kinds of available cantilevers are able to produce good DIC images as long as they provide an evenly mirroring surface.

3.2. LED phase contrast

The LED ring phase contrast image (Fig. 3c) shows the two cells together with the AFM cantilever. This image complements the DIC image since it shows the entire field of view except the one shadowed by the cantilever. This option to monitor the whole cell and especially its edge is important to infer its vitality. Compared to the DIC images, the phase contrast images have a higher contrast but seem to be somewhat lower in resolution.

The main reason for this is the relatively wide radiation angle of the used LEDs. A second reason for a certain lack of resolution is the missing segment in the LED ring.

The improvement of the illumination geometry will be the topic of further studies. The use of new types of LEDs with a better defined emission geometry and an additional annular diaphragm below the LED ring will be first approaches. The cells shown in Fig. 3a–c are all kept in a buffer solution in a home-made glass-bottom Petri dish.

3.3. Combined AFM experiments and imaging

The motivation for this development was the need to correlate a certain kind of molecular interaction measured by AFM with the morphology of the cell [16,17]. For this purpose, both the force spectroscopy experiment and the light microscopy had to be carried out simultaneously at a resolution high enough to resolve such characteristic features of the cell like mitochondria and lysosomes. The corresponding single-molecule force spectroscopy experiments will be reported in detail in a future publication. Here, only one example of a typical force curve is given in Fig. 4. The epithelial cell was contacted with an AFM tip which was functionalized with poly-l-lysine to mediate the adhesion to negatively charged membrane markers. Upon retraction, the cytoskeleton-anchored proteins, which bound to the tip, provide enough stability so that several membrane tethers are pulled out of the cell surface. These tethers rupture in quantized steps of roughly 80 pN in force upon further retraction of the tip.

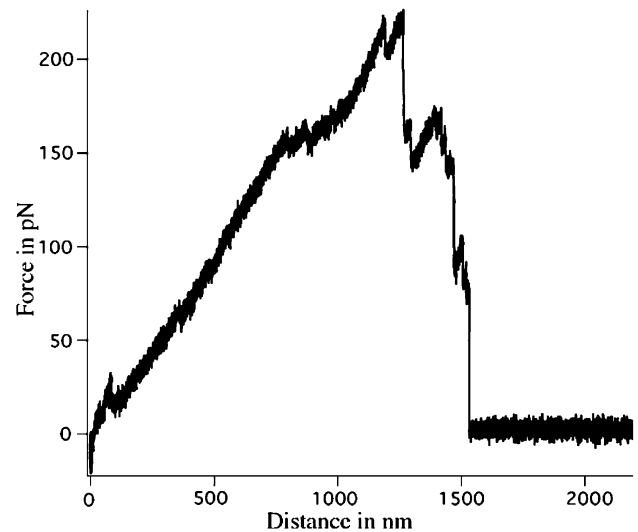


Fig. 4. Protocol of a force spectroscopy scan on an epithelial cell. Once brought into contact, the cell membrane attaches to the adherent AFM-tip via cytoskeleton anchored membrane proteins. Upon retraction several membrane tethers are pulled which rupture one by one, lowering the force acting on the cantilever by approximately 80 pN each.

4. Concluding remarks

During day-to-day use, this combination of high-resolution optical microscopy with scanning probe techniques turned out to be an extremely versatile extension of the experimental options. Localization and identification of cells and their organelles became a reliable and easy procedure prior to and during force spectroscopy. Moreover, experiments with small objects like bacteria became possible and are routine now. We built the LED ring into the cantilever holder of our home-made AFMs but it may easily be implemented in commercial instruments.

LED ring phase contrast and quasi-trans DIC illumination complement each other in a very beneficial way: while the quasi-trans DIC technique allows the observation of a specimen directly under the cantilever and its tip, the phase contrast illumination provides an image of the area surrounding the cantilever. If needed, the full field of view can be seen by DIC illumination from the cantilever chip.

Furthermore, phase contrast and differential interference contrast microscopy can be combined

with other optical techniques like fluorescence imaging to obtain supplementary information [18,19]. Expansion and improvements of our hybrid system will therefore be the matter of future work.

Acknowledgements

This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft. Helpful discussions with Julia Schmitz, Julia Morfill and Ferdinand Kühner as well as technical support from Asylum Research Inc. (Santa Barbara, CA, USA), Christian Holopir-ek and Michael Etterer are gratefully acknowledged.

References

- [1] G. Binnig, C.F. Quate, C.H. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* 56 (1986) 930.
- [2] B. Drake, C.B. Prater, A.L. Weisenhorn, S.A.C. Gould, T.R. Albrecht, C.F. Quate, D.S. Cannell, H.G. Hansma, P.K. Hansma, *Science* 243 (1989) 1586.
- [3] C.A.J. Putman, K.O. van der Werf, B.G. de Grooth, N.F. van Hulst, F.B. Segerink, J. Greve, *Rev. Scien. Instrum.* 63 (1992) 1914.
- [4] J. Domke, S. Dannöhl, W.J. Parak, O. Müller, W.K. Aicher, M. Radmacher, *Colloid. Surface. B* 19 (2000) 367.
- [5] A.B. Mathur, G.A. Truskey, W.M. Reichert, *Biophys. J.* 78 (2000) 1725.
- [6] A. Sarkar, R.B. Robertson, J.M. Fernandez, *PNAS* 101 (2004) 12882.
- [7] M. Benoit, D. Gabriel, G. Gerisch, H.E. Gaub, *Nat. Cell Biol.* 2 (2000) 313.
- [8] E.L. Florin, V.T. Moy, H.E. Gaub, *Science* 264 (1994) 415.
- [9] M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, H.E. Gaub, *Science* 275 (1997) 1295.
- [10] E. Hecht, *Optics*, second ed, Addison-Wesley, Reading, MA, 1990.
- [11] F. Zernike, *Physica* 9 (1942) 686.
- [12] F. Zernike, *Physica* 9 (1942) 974.
- [13] M.W. Davidson, M. Abramowitz, *Optical Microscopy*, Review Edition, Olympus America Inc., Melville, New York, USA, 1999.
- [14] D.B. Murphy, J. Hinsch, E.D. Salmon, K.R. Spring, H.E. Keller, M. Abramowitz, M.W. Davidson, *Fundamental Concepts in DIC Microscopy*, Tallahassee, Florida, USA, 2003 <http://www.microscopy.fsu.edu/primer/techniques/dic/>.
- [15] C. Brandmaier, K.R. Spring, M.W. Davidson, *Reflected Light DIC Microscopy*, Tallahassee, Florida, USA, 2003 <http://www.microscopyu.com/articles/dic/reflecteddic.html>.
- [16] B.M.G. O'Hagan, P. Doyle, J.M. Allen, K. Sutton, G. McKerr, *Ultramicroscopy* 102 (2004) 1.
- [17] M. Radmacher, M. Fritz, C.M. Kacher, J.P. Cleveland, P.K. Hansma, *Biophys. J.* 70 (1996) 556.
- [18] M. Radmacher, K. Eberle, H.E. Gaub, *Ultramicroscopy* 42 (1992) 968.
- [19] P.G. Haydon, R. Lartius, V. Parpura, S.P. Marchese-Ragona, *J. Microsc. (oxford)* 182 (1996) 114.

B-S Transition in Short Oligonucleotides

Julia Morfill, Ferdinand Kühner, Kerstin Blank, Robert A. Lugmaier, Julia Sedlmair, and Hermann E. Gaub
Lehrstuhl für Angewandte Physik & Center for Nanoscience, Ludwig-Maximilians-Universität München, Munich, Germany

ABSTRACT Stretching experiments with long double-stranded DNA molecules in physiological ambient revealed a force-induced transition at a force of 65 pN. During this transition between B-DNA and highly overstretched S-DNA the DNA lengthens by a factor of 1.7 of its B-form contour length. Here, we report the occurrence of this so-called B-S transition in short duplexes consisting of 30 basepairs. We employed atomic-force-microscope-based single molecule force spectroscopy to explore the unbinding mechanism of two short duplexes containing 30 or 20 basepairs by pulling at the opposite 5' termini. For a 30-basepair-long DNA duplex the B-S transition is expected to cause a length increase of 6.3 nm and should therefore be detectable. Indeed 30% of the measured force-extension curves exhibit a region of constant force (plateau) at 65 pN, which corresponds to the B-S transition. The observed plateaus show a length between 3 and 7 nm. This plateau length distribution indicates that the dissociation of a 30-basepair duplex mainly occurs during the B-S transition. In contrast, the measured force-extension curves for a 20-basepair DNA duplex exhibited rupture forces below 65 pN and did not show any evidence of a B-S transition.

INTRODUCTION

The elastic and mechanical behavior of long double-stranded DNA has been investigated using a variety of techniques, which cover a broad range of forces from a few piconewton up to several hundred piconewtons. For example, magnetic beads (1), glass microneedles (2), optical traps (3,4), and the atomic force microscope (AFM) (5) have been used to investigate the response of long λ -DNA to externally applied forces. These stretching experiments of λ -DNA exhibit a highly cooperative transition at a force of 65–70 pN, which refers to the conversion of B-DNA into an overstretched conformation called S-DNA. Hereby the DNA molecule stretches up to a factor of 1.7 of its B-form contour length. Besides force spectroscopy experiments, molecular dynamic simulations, and various theoretical approaches give detailed insights into the processes of this so-called B-S transition (6–13).

A detailed analysis of the B-S transition was performed with single molecule force spectroscopy using the AFM. In 1999, Rief et al. (5) were the first to analyze long λ -DNA with the AFM. λ -DNA was adsorbed nonspecifically to a gold surface and picked up with a cantilever in the next step. Upon retraction, the double-stranded DNA molecule, attached via the 3' and 5' terminus of the same strand is stretched between the cantilever tip and the gold surface until the complementary strand melts off. Fig. 1 shows a typical example of the force-extension curves for λ -DNA, which exhibits an overstretching B-S transition at a force of 65 pN. During this

transition the force-extension curve shows a lengthening of the double-stranded λ -DNA by a factor of 1.7. At forces higher than 65 pN a second transition occurs, which is discussed in the literature to be a force-induced melting transition (5). During this transition the double-stranded DNA is split into two single strands. Upon further extension, the force increases drastically until the remaining single-stranded DNA finally ruptures. The B-S transition and the melting transition exhibit a significant thermodynamic difference: The B-S transition is represented by a force plateau in the force-extension curve and is independent of the pulling speed. Therefore, it can be considered as an equilibrium process within the timescale of the performed experiments. In contrast, the melting transition shows a very steep force increase and a pronounced speed dependence. Therefore this transition occurs in nonequilibrium (5). In contrast to this approach, theoretical analyses exist, which interpret the B-S transition as a force-induced melting transition (14,15). It was shown that this interpretation can quantitatively describe the thermodynamics of DNA overstretching (16).

In addition to λ -DNA, which contains a mixture of A-T and G-C basepairs, Rief et al. measured long double-stranded poly(dG-dC) and poly(dA-dT) sequences to obtain information about the sequence dependence of the B-S transition. The B-S transition for double-stranded poly(dG-dC) also occurred at a force of 65 pN whereas the force-extension curves for poly(dA-dT) sequences showed a force of 35 pN. Further investigations of the nature of the B-S transition were carried out by Clausen-Schaumann et al., Williams et al., and Wenner et al. (17–20). They analyzed the influence of the position of attachment, the salt concentration, the temperature, and the pH on the B-S transition. If the DNA molecule was attached to the cantilever tip and the gold surface with both strands simultaneously, the overstretching transition was shifted to higher force values of 105 pN and showed less

Submitted February 7, 2007, and accepted for publication May 29, 2007.

Address reprint requests to Julia Morfill, Tel.: 49-89-2180-2306; Fax: 49-89-2180-2050; E-mail: julia@morfill.de.

Kerstin Blank's present address is Institut de Science et d'Ingénierie Supramoléculaires (ISIS), Laboratoire de Biologie Chimique, 8, allée Gaspard Monge, BP 70028, 67083 Strasbourg Cedex, France.

Editor: Petra Schwille.

© 2007 by the Biophysical Society

0006-3495/07/10/2400/10 \$2.00

doi: 10.1529/biophysj.107.106112

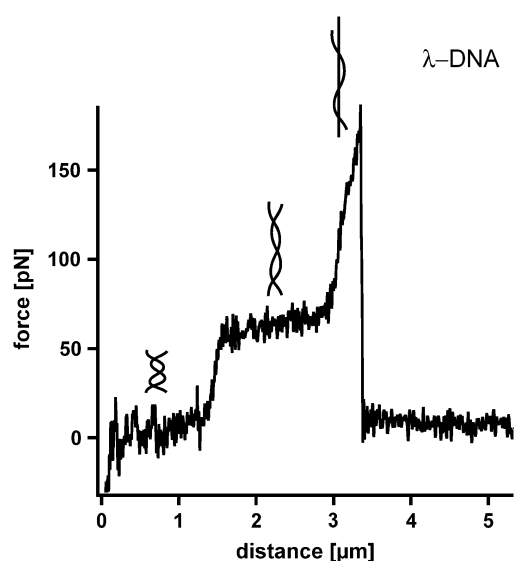


FIGURE 1 Force-extension curve of double-stranded λ -DNA. While retracting the cantilever from the surface with a velocity of $16 \mu\text{m/s}$ the double-stranded λ -DNA is stretched. At a force between 65 and 70 pN the well-known highly cooperative B-S transition is observed. During this transition the DNA duplex lengthens by a factor of 1.7. After this transition the force increases to a value of ~ 170 pN where the DNA finally ruptures.

cooperativity. For salt (NaCl) concentrations higher than 150 mM, the B-S transition occurred at forces of 65 pN. For salt concentrations lower than 150 mM the force decreased and the B-S transition exhibited less cooperativity. Without any salt, the DNA molecules denatured upon stretching and very short or no B-S plateaus were observed. Further measurements showed, that the force of the B-S transition was reduced when the temperature was increased. In addition, higher and lower pH than the physiological pH of 7.4 led to lower B-S transition forces.

Whereas all above experiments have been carried out with long double-stranded DNA, which was attached randomly to gold surfaces, a different approach was followed in the experiments of Strunz et al. (21) and Pope et al. (22). Instead of attaching double-stranded DNA to a surface and picking it up nonspecifically with the cantilever tip two complementary single strands were covalently coupled to the cantilever tip and the surface. Upon approach of the cantilever tip to the surface, the complementary DNA strands hybridized and formed a duplex. Upon retraction of the cantilever tip the hybridized DNA was loaded with an increasing force until the hydrogen bonds between the two complementary strands ruptured. An advantage of this kind of measurement is that the DNA duplex is coupled to the surface and the cantilever at a defined position and that the interaction can be probed many times to gain high statistics. In addition, if oligonucleotides are used the entire sequence of the DNA duplex is known.

In Strunz et al. the measured unbinding forces of short oligonucleotides (30, 20, and 10 basepairs) were found to be a function of the applied loading rate and the number of

basepairs. This indicates that the dissociation is a non-equilibrium process. In many cases the unbinding process of receptor ligand interactions can be described with a two-state model where one state represents the bound and the other state the unbound conformation of the interaction. Based on the work of Bell (23), Evans et al. developed a model to describe a two-state system under an externally applied force (24). The externally applied force reduces the unbinding barrier, which the ligand has to overcome by thermal fluctuations. This well-known Bell-Evans model was applied to analyze the obtained data for the different DNA duplexes. Because no B-S transition was observed in the measurements of Strunz et al. the unbinding of the DNA duplexes could be approximated with a two-state system and the unbinding forces showed the expected dependence on the loading rate. However, it was pointed out, that the B-S transition might be present, but could not be resolved due to experimental noise.

In this study, we performed single molecule force spectroscopy using high-resolution cantilevers to investigate DNA duplexes containing 20 and 30 basepairs concerning their conformational change during dissociation. In addition, these results were compared with measurements of 1000-basepair-long DNA duplexes.

These lengths for the short duplexes were chosen, because the data of Strunz et al. (21) suggest that the rupture forces of a 20 basepair duplex do not reach the critical force value of 65 pN whereas some rupture events for a 30 basepair duplex reach rupture forces higher than 65 pN. The measurements were performed at various loading rates to obtain a detailed picture of the presence of the B-S transition in short oligonucleotides.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of slides and cantilevers for the measurements with λ -DNA

λ -BstEII digest DNA (length distribution, 117–8454 basepairs) was purchased from Sigma (Deisenhofen, Germany). A solution containing $123 \mu\text{g/ml}$ λ -DNA in phosphate buffered saline (PBS) was incubated on a freshly evaporated gold surface for 30 min at a temperature of 70°C . Finally the gold surface was rinsed with PBS (10 mM Na phosphate, pH 7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl) and stored in PBS until use. The force spectroscopy experiments were performed with cantilevers (Bio-lever, Olympus, Tokyo, Japan) additionally coated with gold at room temperature.

Preparation of slides and cantilevers for the measurements with 1000-basepair-long DNA

A 1000-basepair-long DNA duplex (DNA1000s) was generated with polymerase chain reaction using 5' thiol-modified primers. The polymerase chain reaction product was purified with gel electrophoresis followed by gel extraction. The final DNA concentration, as determined from the absorbance at 260 nm was $15 \text{ ng}/\mu\text{l}$. The DNA, diluted in H_2O , was incubated on a gold surface in a humid chamber for 1 h. In the same way, the DNA was coupled to the cantilever (Bio-lever, Olympus) additionally coated with gold. After washing with H_2O , the cantilever and the surface, covered with H_2O were

heated up to 90°C to separate the double-stranded DNA into single strands. Finally, the surfaces were rinsed with PBS to remove unbound DNA and stored in PBS until use.

Preparation of slides and cantilevers for the measurements with short oligonucleotides

Oligonucleotides modified with a thiol group at their 5'-termini (for details see Table 1; IBA GmbH, Göttingen, Germany; metabion GmbH, Martinsried, Germany) were immobilized on amino-functionalized surfaces using a heterobifunctional poly(ethylene glycol) (PEG) spacer (25). One oligonucleotide was immobilized on the cantilever and the oligonucleotide with the complementary sequence was coupled to the surface. The cantilevers (Bio-lever, Olympus) were cleaned as described (26). Amino-modified surfaces on the cantilevers were prepared using 3-aminopropyltrimethoxysilane (ABC R GmbH, Karlsruhe, Germany) (26). Commercially available amino-functionalized slides (Slide A, Nexterion, Mainz, Germany) were used. From now on, both surfaces (cantilever and slide) were treated in parallel as described previously (27). They were incubated in borate buffer pH 8.5 for 1 h. This step was necessary to deprotonate the amino groups for coupling to the *N*-hydroxysuccinimide (NHS) groups of the heterobifunctional NHS-PEG-maleimide (molecular weight, 5000 g/mol; Nektar, Huntsville, AL). The PEG was dissolved in a concentration of 50 mM in borate buffer at pH 8.5 and incubated on the surfaces for 1 h. In parallel, the oligonucleotides were reduced using tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride beads (Perbio Science, Bonn, Germany) to generate free thiols. After washing the surfaces with ultrapure water, a solution of the oligonucleotides (1.75 μ M) was incubated on the surfaces for 1 h. Finally, the surfaces were rinsed with PBS to remove noncovalently bound oligonucleotides and stored in PBS until use.

Force spectroscopy

All force measurements were performed in PBS containing 150 mM NaCl at room temperature using an MFP-3D AFM (Asylum Research, Santa Barbara, CA). Cantilever spring constants ranged from 7 to 20 pN/nm (B-Bio-Lever and B-Bio-Lever coated with gold) and from 30 to 40 pN/nm (A-Bio-Lever and A-Bio-Lever coated with gold) and were measured as described previously (28,29). During one experiment, the approach and retract velocity were held constant, whereas the contact time on the surface was adjusted to obtain single binding events. To achieve satisfactory statistics, several hundreds of approach-retract cycles were carried out. To obtain measurements over a broad range of different loading rates, several experiments were performed each at a different retract velocity ranging from 50 nm/s to 10 μ m/s.

Data extraction

The obtained data were converted into force-extension curves. From these force-extension curves, the rupture force (the force at which the DNA strands open), the rupture length, and the corresponding loading rate were determined using the software Igor Pro 5.0 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR) and a custom-written set of procedures. The rupture force was defined as described previously (24,30). To determine the loading rate, the freely

jointed chain fit (FJC) to the force-extension curve was used, according to previous studies (31).

Data analysis

To analyze the data set of one experiment, which was recorded at a constant retract velocity, the rupture forces and the corresponding loading rates were plotted in two histograms. The histograms were analyzed with two methods, which are based on the well-known Bell-Evans-model (23,24,30). For analysis of the data with the loading-rate-based method, the force and the loading rate (plotted logarithmically) histogram were fitted with a Gaussian distribution to determine the maxima of the respective histograms. These maxima were determined for each data set, ergo for each retract velocity and finally plotted in a force versus loading rate (pictured logarithmically) diagram. The maximum force represents the most probable force F^* :

$$F^* = \frac{k_B \times T}{\Delta x} \ln \frac{\dot{F} \times \Delta x}{k_B \times T \times k_{\text{off}}}, \quad (1)$$

with k_B is the Boltzmann constant, T is the temperature, Δx is the potential width, k_{off} is the natural dissociation rate at zero force, and $\dot{F} = dF/dt$ is the loading rate. From a linear fit of the force versus loading rate (pictured logarithmically) plot and Eq. 1, the natural dissociation rate k_{off} and the potential width Δx of the DNA complex can be determined. Whereas the above-mentioned method requires measurements at different retract velocities, the values for k_{off} and Δx can be obtained from one data set measured at one retract velocity when using the following method, which was introduced by Friedsam et al. (30). It takes into account a distribution of the spacer lengths between the interaction, which needs to be measured and the surfaces. The bond rupture probability density function $p(F)$ was calculated according to Eq. 2 for every spacer length in the measured rupture length histogram.

$$p(F) = k_{\text{off}} \times \exp\left(\frac{F \times \Delta x}{k_B \times T}\right) \frac{1}{\dot{F}} \times \exp\left(-k_{\text{off}} \int_0^F dF' \exp\left(\frac{F' \times \Delta x}{k_B \times T}\right) \frac{1}{\dot{F}}\right). \quad (2)$$

According to the obtained rupture force histogram the $p(F)$ functions were weighted and finally added up. This results in a semihypothetical rupture force histogram based on the two input parameters k_{off} and Δx , which were varied to find the best fit to the measured rupture force histogram. Therefore, the $p(F)$ -based method also considers the shape of the measured rupture force histogram. Additionally, the probability density function $p(F)$ was convolved with a Gaussian distribution to consider the detection noise. The standard deviation of the Gaussian distribution equals the typical noise value of the cantilever, which was used in the experiment (32).

Proof of specificity

To prove the specificity of the interactions for the measurements with DNA30s and DNA20s, the following experiments were performed. First, single-stranded DNA was measured against surfaces or cantilevers without the complementary oligonucleotide. Less than 1% nonspecific interactions were detected in ~ 1000 force-extension curves. Second, measurements

TABLE 1 DNA sequences

DNA duplex	Sequence (cantilever)	Sequence (slide)
DNA30s	5'SH-TTTT'TTTT'TTTT'TTTT'TCG TTGGTGC GGATATCTCGG TAGTG GGATACGACGATACCGAAGACAG CTCATGTTATATTATG-3'	5'SH-TTTT'TTTT'TTTT'TATCCCACTA CCGAGATATCCGCACCAACG-3'
DNA20s	5'SH-TTTT'TTTT'TTTT'TTTT'TCG TTGGTGC GGATATCTCGG TAGTG GGATACGACGATACCGAAGACAG CTCATGTTATATTATG-3'	5'SH-TTTT'TTTT'TTTT'TCCGAGATATC CGCACCAACG-3'

were performed with noncomplementary DNA strands. Thereby <4% interactions were detected. In contrast, 47% interactions were found for two complementary DNA oligonucleotides.

In addition, force clamp experiments were performed for DNA20s and DNA30s to distinguish the measured unbinding process from a so-called bulge-slipping process, dominated by the slippage of bulges in the backbone of repetitive DNA, as shown in Kühner et al. (25,33). The obtained force plateaus for DNA30s displayed equilibrium properties and did not show any discrete lengthening steps of the DNA duplex (data not shown). In addition, the obtained plateaus, which refer to the B-S transition, occurred at much higher forces than the forces of the slipping process.

RESULTS

To analyze the interaction between complementary DNA strands with various lengths (1000 basepairs, 30 basepairs, and 20 basepairs), single molecule force spectroscopy measurements were performed with an AFM.

DNA1000s

The analysis of DNA containing 1000 basepairs (DNA1000s) required the following setup (see Fig. 2 *a*, inset). Complementary single-stranded DNA was covalently attached to a surface and a cantilever tip at its 5' terminus. In the next step the surface was approached with the tip of the cantilever, allowing two complementary single strands to hybridize and form a duplex. Subsequently the cantilever was retracted and the DNA duplex was loaded with an increasing force until it finally ruptured and the cantilever relaxed back into its equilibrium position. The force applied to the DNA duplex was recorded as a function of the distance between the cantilever tip and the surface. Fig. 2 *a* shows an example of a so-called force-extension curve of a DNA duplex with <1000 basepairs. At 65 pN the force-extension curve exhibits a region of constant force, which corresponds to the transition between B-DNA and the highly overstretched S-DNA (B-S transition). During this transition the DNA duplex lengthens by a factor of 1.7. In the example shown, incomplete hybridization of the DNA duplex results in a B-S transition length of only 25 nm. This corresponds to a hybridized DNA duplex containing 105 basepairs. The number of basepairs can be obtained from the length difference between the unstretched and the stretched conformation of the DNA duplex. The length of the unstretched DNA duplex can be calculated from the distance between two basepairs in double-stranded B-DNA, $l_d = 0.34$ nm. Correspondingly a DNA duplex with 105 basepairs has a length of 105×0.34 nm = 35.7 nm. The length of the stretched DNA duplex at the end of the B-S transition then corresponds to $35.7 \times 1.7 = 60.7$ nm. The length difference between these two conformations (i.e., the length of the plateau) is 25 nm. Upon further extension the force increases to a value of ~130 pN where the DNA duplex finally dissociates.

Fig. 2 *b* shows the rupture force histogram of double-stranded DNA with up to 1000 basepairs, recorded at a

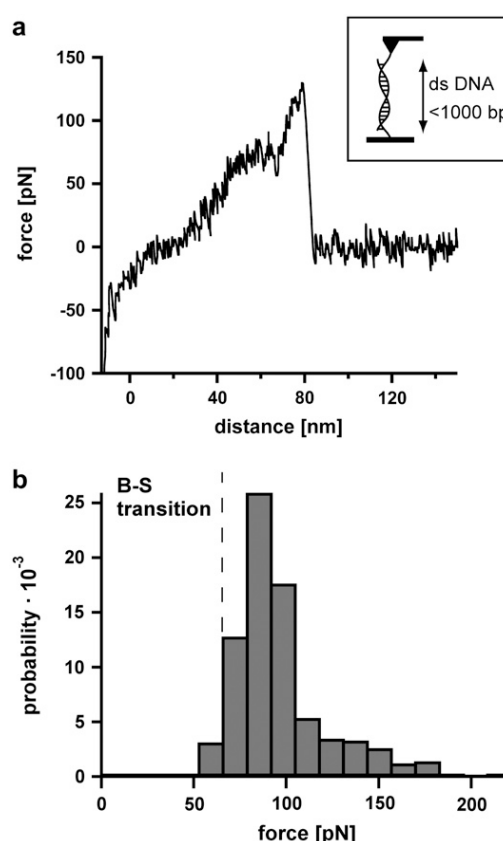


FIGURE 2 Measurements with 1000-basepair-long double-stranded DNA (DNA1000s). (*a*) Example of a typical force-extension curve. The inset shows the experimental setup. Complementary single strands are attached to the tip of a cantilever and the surface. By lowering the cantilever, the two single strands hybridize and form a duplex. By retracting the cantilever from the surface the DNA duplex is loaded with force until it finally ruptures. The force-extension curve (recorded at a velocity of 632 nm/s) exhibits a B-S transition between 65 and 75 pN. Due to incomplete hybridization the B-S transition only shows a lengthening of 25 nm, which corresponds to a DNA duplex with 105 basepairs. After the B-S transition the force increases to a value of ~130 pN where the DNA finally ruptures. (*b*) Histogram of the rupture forces of DNA1000s. The histogram ($FWHM = 37.8$ pN) clearly shows that the DNA duplex ruptures at forces higher than the B-S transition force.

velocity of 632 nm/s. The dissociation process of double-stranded DNA with up to 1000 basepairs peaks at ~85 pN, which is significantly above the B-S transition. This leads to the conclusion that double-stranded DNA in the highly overstretched and underwound S-conformation still has a certain stability and is not separated by the transition itself. This is in accordance with Rief et al. (5), who found a second force-induced melting transition at forces higher than 65 pN. The measured rupture forces are broadly distributed (full-width at half-maximum ($FWHM$) is 37.8 pN). The width of this distribution is most likely the result of nonperfect hybridization of the long oligonucleotides or by their fragmentation during the harsh coupling reaction to the surfaces.

DNA30s

The experimental setup in Fig. 3 was used for the analysis of the short oligonucleotides containing 30 basepairs (DNA30s) and 20 basepairs (DNA20s). As stated above, the length of these duplexes was chosen because the data of Strunz et al. (21) suggest that the B-S transition might be present in a 30-basepair duplex but not in a 20-basepair duplex. The sequences of these oligonucleotides have been checked carefully to minimize self-complementarity. To reduce uncertainties due to the surface chemistry the oligonucleotides were coupled to a polyethylene glycol (PEG)-modified surface and cantilever via a thiol group at their 5' termini. The usage of the elastic spacer PEG minimizes nonspecific interactions and maximizes the probability of detecting specific and single rupture events. Moreover, it prevents a shift to lower unbinding forces otherwise caused by thermal fluctuations of the cantilever.

In all experiments the surface was approached with the tip of the cantilever, allowing two single complementary DNA strands to hybridize and to form a duplex. The cantilever tip was then retracted from the surface and the DNA duplex was loaded with an increasing force until it finally ruptured. Subsequently the cantilever relaxed into its equilibrium position. The force applied to the DNA duplex was recorded as a function of the distance between the cantilever tip and the surface. The elastic properties of PEG lead to a characteristic force-extension curve if an external force is applied. This force-extension curve of the PEG spacer can be fitted with a two-state FJC model with the values from the literature (31). As the complementary oligonucleotides were coupled via a PEG spacer specific interactions can be selected based on the characteristic shape of the force-extension curve resulting from the PEG spacer and the expected length of the PEG spacer.

The B-S transition for an oligonucleotide with 30 basepairs (DNA30s) would lead to an extension of 6.3 nm from 9 nm in the B-conformation to 15.3 nm in the S-conformation and therefore should be detectable with high-resolution force spectroscopy. Fig. 4 shows two typical force-extension

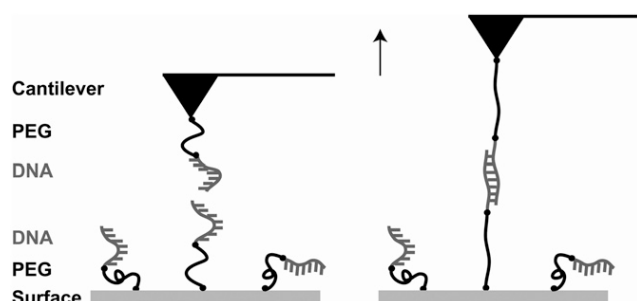


FIGURE 3 Experimental setup for the measurements with the short DNA duplexes DNA30s and DNA20s. The complementary single strands possessing a thiol-group at their 5'-termini were covalently immobilized on amino-functionalized glass slides/cantilevers using a heterobifunctional PEG spacer.

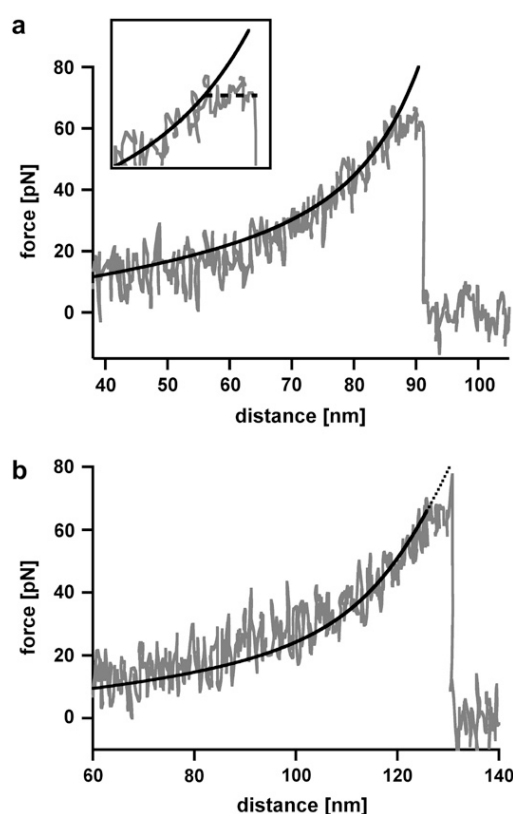


FIGURE 4 Measurements with 30-basepair-long double-stranded DNA (DNA30s). (a) Example of a force-extension curve of DNA30s possessing a B-S transition. The force-extension curve shows a rupture event of a hybridized 30 basepair DNA duplex, recorded at a retract velocity of 895 nm/s. At a force of 64 pN, the force-extension curve shows a short plateau with a length of ~ 6 nm (see *inset*; it spans an area of 40 pN and 18 nm), which corresponds to the B-S transition. During this transition the double-stranded DNA dissociates. The black curve shows a two-state FJC-fit to the force-extension curve, which describes the elastic behavior of the PEG-DNA complex. The FJC-fit follows the force-extension curve up to the point where the DNA elongates due to the B-S transition. This region of constant force diverges from the FJC-fit by a value of up to 6 nm (shortly before rupture). (b) Example of a force-extension curve of DNA30s possessing a B-S transition followed by an additional force increase. At a force of 64 pN, the force-extension curve, which has been recorded at a retract velocity of 895 nm/s, shows a short plateau with a length of ~ 6 nm. Again, this plateau corresponds to the B-S transition. After this transition the force increases to a value of 78 pN, where the DNA duplex finally dissociates. The elastic behavior of the PEG-DNA complex is described with a two-state FJC-fit (black curve), which follows the force-extension curve up to the plateau of the B-S transition. This example curve is representative for $\sim 10\%$ of the measurements.

curves of DNA30s, recorded at a retract velocity of 895 nm/s. At a force of 64 pN the force-extension curve in Fig. 4 a shows a short plateau corresponding to a length of ~ 6 nm. This plateau refers to the transition between the B-conformation and the S-conformation of the DNA duplex. During this B-S transition the DNA duplex dissociates. The force-extension curve in Fig. 4 b again shows a B-S transition at a force of 64 pN represented by a short plateau with a length of

~6 nm. Upon further extension, the force increases to a value of 78 pN, where the DNA duplex finally dissociates. The black curves in Fig. 4, *a* and *b*, represent the theoretical extension behavior of the PEG spacer, modeled with a two-state FJC function, which describes the enthalpic and entropic behavior of polymers under an externally applied force (31). For both cases the FJC curve follows the force-extension curve up to the plateau of the B-S transition. At this point the DNA molecule gets elongated and the FJC-fit therefore deviates from the obtained force-extension curve.

Fig. 5 *a* shows the measured rupture force distribution, recorded at a retract velocity of 895 nm/s. The force histogram ($FWHM = 14.2$ pN) contains ~860 single rupture events and covers forces lower and higher than the critical B-S transition force. More than 50% of the experimentally obtained force-extension curves in this experiment ruptured at forces below 65 pN and therefore did not show the B-S transition. About 30% of the rupture events had short plateaus with lengths between 3 and 7 nm, before dissociating. Less than 10% of the force-extension curves exhibited rupture forces above the B-S transition and showed an additional force increase to 70–80 pN (see Fig. 4 *b*). The rupture force histogram was fitted in two ways: First, a Gaussian fit (not

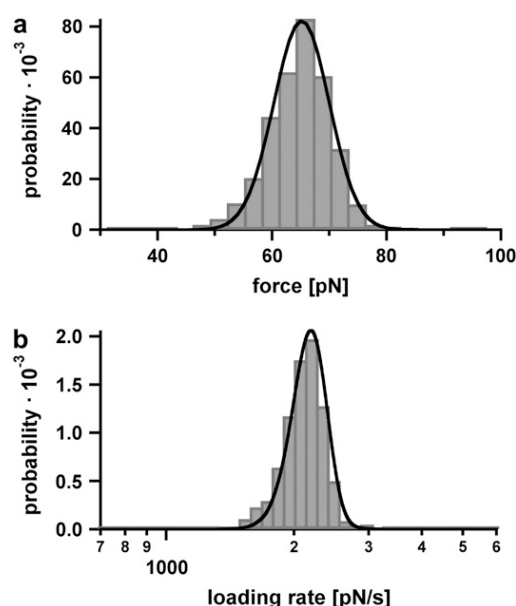


FIGURE 5 Example of the measured rupture force and loading rate distributions for the 30-basepair duplex. (*a*) Histogram of the unbinding forces of DNA30s. The histogram ($FWHM = 14.2$ pN) contains ~860 rupture events and exhibits rupture forces above the B-S transition of 65 pN. The histogram is fitted with the calculated probability density function $p(F)$ (black) with $\Delta x = 4.4$ nm and $k_{off} = 7 \times 10^{-28} \text{ s}^{-1}$. To consider the detection noise, the probability density function was convolved with a Gaussian distribution. The standard deviation of the Gaussian distribution equals the typical noise value of the cantilever that was used (4.7 pN). (*b*) Histogram of the loading rates of DNA30s. The obtained loading rate distribution, plotted logarithmically, is compared with the calculated probability density function $p(\ln F)$ (black).

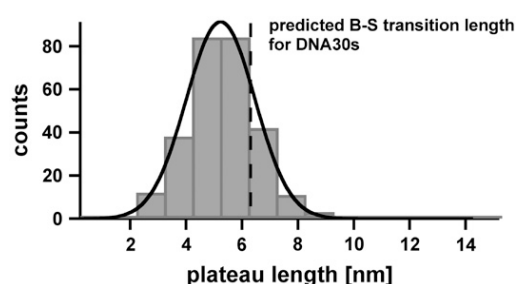


FIGURE 6 Histogram of the plateau lengths of DNA30s. The histogram ($FWHM = 3.4$ nm) contains ~280 rupture events and shows the corresponding plateau lengths, which refer to the B-S transition. The histogram was fitted with a Gaussian curve (black) and yielded a most probable value of 5.2 nm. The theoretically predicted value equals 6.3 nm, which is compatible with the measurements within an overlap probability of 66.5%. The smaller experimental value is most likely due to melting of the DNA duplex during the B-S transition.

shown here) was used to determine the most probable rupture force F_{max} of 65 pN. Second, the rupture force histogram was fitted with the calculated probability density function $p(F)$ (black curve) as described in the Materials and Method section, yielding a potential width of $\Delta x = 4.4$ nm and a natural dissociation rate of $k_{off} = 7 \times 10^{-28} \text{ s}^{-1}$. Fig. 5 *b* shows the corresponding histogram of the loading rates (plotted logarithmically) as computed from the FJC-fits. For the cases where the FJC-fit follows the force-extension curve until the final rupture event, the determined loading rates are reliable. However, if a B-S plateau is present, the loading rate cannot be determined precisely with this procedure. Because the analysis methods are based on a two-state model, a conformational change during the dissociation process distorts the values for k_{off} and Δx . Therefore, the histogram in Fig. 5 *b* contains a certain error. The obtained histograms of the loading rates (plotted logarithmically) were fitted with a Gaussian distribution. This fit yields a maximum probability at 2697 pN s⁻¹.

Fig. 6 shows the histogram of the measured plateau lengths for DNA30s, which refer to the B-S transition. The histogram ($FWHM = 3.4$ nm) contains ~280 rupture events and was fitted with a Gaussian curve (black), which has a maximum probability at 5.2 nm. The theoretical predicted value for DNA30s equals 6.3 nm and corresponds to a probability of overlap of 66.5%. This difference is significant. The shift of the distribution of the received plateau lengths to shorter lengths is most likely due to melting of the double-stranded DNA during the B-S transition.

DNA20s

In contrast to the results obtained for DNA30s, the force-extension curves of the DNA duplex containing 20 basepairs (DNA20s) only show a sharp rupture. Fig. 7 shows a typical force-extension curve of DNA20s, recorded at a retract velocity of 1007 nm/s. The force-extension curve does not

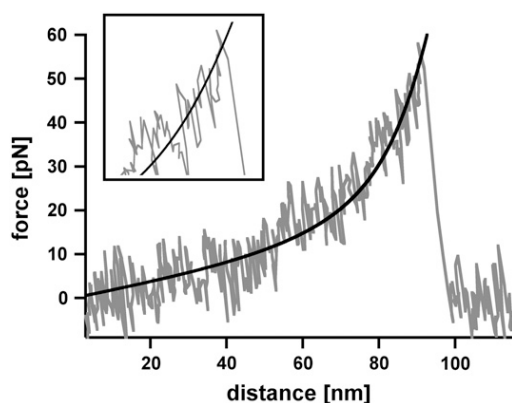


FIGURE 7 Example of a typical force-extension curve of the 20-basepair DNA duplex (DNA20s). The force-extension curve shows a rupture event of a hybridized 20-basepair DNA duplex, recorded at a retract velocity of 1007 nm/s. The DNA duplex dissociates at a force of 53 pN, without showing any evidence of the B-S transition (see *inset*). The force-extension curve of the PEG-DNA complex follows the two-state FJC-fit (black) without possessing a measurable deviation.

show any evidence of a B-S transition and dissociates at a force of 53 pN. Fig. 8, *a* and *b*, show the obtained rupture force and loading rate distributions, which contain ~ 350 single rupture events. From a Gaussian fit to the rupture force histogram (FWHM = 13.9 pN) we obtained a most probable force of 54 pN (not shown here), which is clearly below the most probable force of DNA30s. Additionally, the rupture force distribution was fitted with the calculated probability density function $p(F)$ (black curve) with $\Delta x = 2.7$ nm and $k_{\text{off}} = 6 \times 10^{-13} \text{ s}^{-1}$. The histogram of the loading rates (plotted logarithmically) exhibits a maximum probability at 1808 pN s^{-1} . Compared with DNA30s, the force distribution obtained for DNA20s, which was recorded at a similar loading rate, exhibits a maximum probability at a lower force. Therefore, under equal conditions, the probability to detect the B-S transition for DNA20s is much smaller than for DNA30s, because 97% of the rupture events already take place at forces below the critical B-S transition force of 65 pN. Again the measurements were performed at various loading rates.

Loading rate dependence

Further measurements for both DNA30s and DNA20s were performed to quantify the frequency at which B-S plateaus are observed at different loading rates and to be able to evaluate the data with a second analysis method (loading-rate-based method) to extract Δx and k_{off} . Each data set for DNA20s and DNA30s was measured in one single experiment with one cantilever to avoid spring calibration errors. (If data measured with different cantilevers would be combined, the spring calibration errors could lead to an imprecise analysis of the slope.)

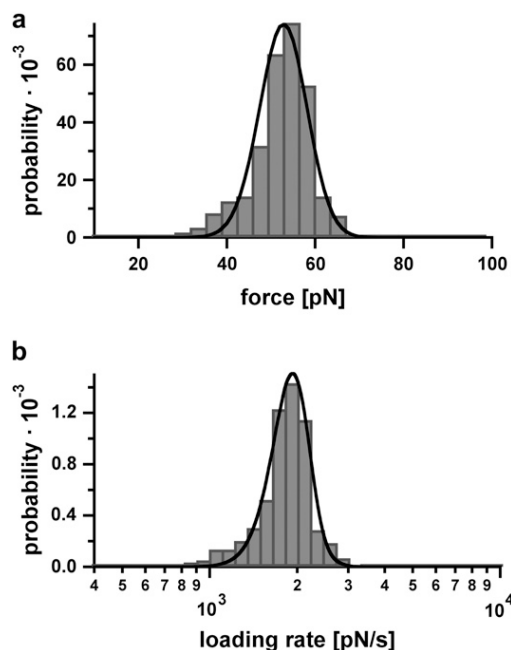


FIGURE 8 Example of the measured rupture force and loading rate distributions for the 20-basepair duplex. (*a*) Histogram of the unbinding forces of DNA20s. The histogram (FWHM = 13.9 pN) contains ~ 350 rupture events. More than 97% of the rupture events occur at forces smaller than the B-S transition of 65 pN. The histogram is fitted with the calculated probability density function $p(F)$ (black) with $\Delta x = 2.7$ nm and $k_{\text{off}} = 6 \times 10^{-13} \text{ s}^{-1}$. To consider the detection noise, the probability density function was convolved with a Gaussian distribution. The standard deviation of the Gaussian distribution equals the typical noise value of the cantilever, which was used (5.0 pN). (*b*) Histogram of the loading rates of DNA20s. The obtained loading rate distribution, plotted logarithmically, is compared with the calculated probability density function $p(\ln F)$ (black).

Measurements at faster loading rates result in higher rupture forces as described by the Bell-Evans model (23,24). Therefore, higher loading rates should increase the probability of reaching forces above 65 pN for DNA30s. This would result in a higher fraction of force-extension curves, which exhibit the B-S transition. Unfortunately, from the measured data we cannot confirm this effect unambiguously because the analysis of the detected plateaus for very high loading rates is difficult due to the limitation of the sampling rate of the data recording hardware. Interestingly, the data points still can be fitted with a straight line (Fig. 9). However, the inclination of the fit for DNA30s in the force versus loading rate diagram (plotted logarithmically) is very flat as would be expected when more and more DNA duplexes rupture during the B-S transition for faster loading rates.

Because the data sets for both DNA30s and DNA20s could be fitted with a straight line, Δx and k_{off} were obtained with the loading-rate-based method in addition. Although the $p(F)$ -based method is an established method for the determination of Δx and k_{off} (30,34) (J. Morfill, K. Blank, C. Zahnd, B. Luginbühl, F. Kühner, K. Gottschalk, A. Plückthun, and H. E. Gaub, unpublished data), the loading-rate-based

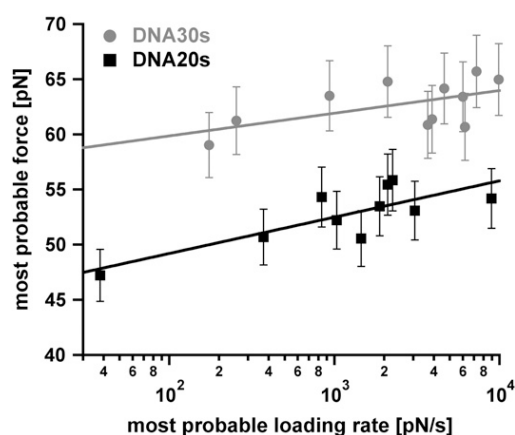


FIGURE 9 Diagram showing the most probable rupture force plotted against the appropriate most probable loading rate (pictured logarithmically) for DNA30s and DNA20s. The data points were gained from the Gaussian fits of the rupture force histogram and the histogram of the loading rates, plotted logarithmically. The gray data points (*circles*) refer to the measurements with DNA30s, the black data points (*squares*) correspond to DNA20s. These respective data points are fitted with a straight line according to the loading-rate-based analysis method. The values for Δx and k_{off} are obtained from Eq. 1. For DNA30s the values are $\Delta x = (4.63 \pm 2.25) \text{ nm}$ and $k_{\text{off}} = (9.62 \times 10^{-28} \pm 3.23 \times 10^{-26}) \text{ s}^{-1}$. For DNA20s the values are $\Delta x = (2.89 \pm 0.77) \text{ nm}$ and $k_{\text{off}} = (8.11 \times 10^{-14} \pm 7.77 \times 10^{-13}) \text{ s}^{-1}$.

method is the commonly used method. For DNA20s the following values for Δx and k_{off} were obtained: $\Delta x = (2.89 \pm 0.77) \text{ nm}$ and $k_{\text{off}} = (8.11 \times 10^{-14} \pm 7.77 \times 10^{-13}) \text{ s}^{-1}$. For DNA30s the values are $\Delta x = (4.63 \pm 2.25) \text{ nm}$ and $k_{\text{off}} = (9.62 \times 10^{-28} \pm 3.23 \times 10^{-26}) \text{ s}^{-1}$. These values are in good agreement with the values obtained with the $p(F)$ -based analysis method.

DISCUSSION

As indicated in the introduction, Strunz et al. measured the unbinding forces of short complementary oligonucleotides with 30, 20, and 10 basepairs (21). In their measurements they did not observe the B-S transition. However, it was pointed out, that a few unbinding events of the duplex, consisting of 30 basepairs, occur at forces higher than the critical force of the B-S transition. Due to experimental noise the B-S transition could not be resolved in their study. To analyze this critical force regime in greater detail, we performed single molecule force spectroscopy experiments with short DNA duplexes consisting of 20 basepairs (DNA20s) and 30 basepairs (DNA30s) with high-resolution cantilevers. To obtain good statistics, both complementary DNA strands were covalently immobilized to a cantilever tip and a surface. The use of identical chemistry on both sides (cantilever tip and surface) and the use of PEG as a spacer reduce the probability of nonspecific binding events to a minimum. Therefore, a high frequency of specific interactions allowed the measurement of a high number of force-extension curves at various

loading rates. The usage of Bio-levers ensured a high force resolution and therefore a detailed analysis of the obtained data.

The recorded force-extension curves for DNA30s clearly show a deviation from the two-state FJC-fit and exhibit a region of constant force at 65 pN. By assuming that PEG follows its characteristic extension curve, we conclude that the DNA duplex is elongated by 3–7 nm (see Fig. 6) and that this lengthening refers to the transition between the B-conformation and the highly overstretched S-conformation of the DNA. The obtained force-extension curves for the oligonucleotide DNA20s do not show any deviation from the two-state FJC-fit (see Fig. 7) for all applied loading rates and mainly exhibit rupture forces below the B-S transition. We conclude that in our experimental setup the applied loading rates are not high enough to reach the critical force of the B-S transition for DNA20s. Therefore, DNA20s can be approximated with a two-state system and the methods used for the analysis of the data are applicable to this system. As expected, higher loading rates shift the rupture force distribution for DNA20s to higher values and therefore to higher rupture forces. The determined value for k_{off} can be considered to represent the natural off-rate of this particular DNA duplex.

In contrast, many rupture events for DNA30s exhibit the typical force plateau of the B-S transition. This leads to the following problems for the analysis of the data. First, as the most probable force increases with the loading rate, one would expect, that a higher fraction of duplexes reaches the critical force of the B-S transition for higher loading rates. As indicated earlier, from the measured data we cannot confirm this effect unambiguously. However, an increasing fraction of duplexes, which reaches the B-S transition, would jolt the rupture force histogram and therefore would shift the maximum probability of the rupture force to lower forces. Second, due to the occurrence of the B-S transition for DNA30s, the determination of the loading rate by means of the two-state FJC-fit is inaccurate. Third, the fact that S-DNA is present with a certain frequency marks a “third state”. Hence, the data analysis based on a two-state system, leads to imprecise values for the potential width Δx and the dissociation rate k_{off} . All these effects can contribute to the relatively flat slope of DNA30s in the plot of the most probable rupture forces against the corresponding most probable loading rates (Fig. 9). Therefore, for DNA30s the obtained value for k_{off} most likely does not represent the natural off-rate although the data can be fitted with a straight line (within the statistical errors) when using the loading-rate-based analysis method.

As has been shown recently by Kühner et al. (36,37), different pulling angles ϕ will affect the measured rupture forces, detected by the cantilever, of short DNA duplexes. These measured rupture forces decrease by a factor of $\cos(\phi)$ for increasing pulling angles and reduce the most probable rupture force of a 30-basepair duplex to a value of $\sim 30 \text{ pN}$ for a pulling angle of $\sim 65^\circ$. In these experiments the DNA

hybridizes when the cantilever comes in contact with the surface. Because the PEG-DNA complexes form random coils at the surface and the cantilever tip (see Fig. 3), the anchor points for the two hybridizing oligos are in close proximity so that the applied force is nearly vertical when the cantilever is retracted. Thus, within a window of $\pm 10^\circ$ the pulling angle has very little influence and only results in 2% smaller rupture forces. This shift in the rupture force is below the error of measurement. Therefore, small variations in the pulling angle will hardly affect the measured rupture and also B-S transition forces.

The finding that the B-S transition can be observed in short oligonucleotides has various important implications for force-based experiments with DNA oligonucleotides. Oligonucleotides have been used as DNA handles for the immobilization of RNA to different surfaces (38). In addition, DNA can be used as a force standard. This force standard can be used for detection purposes if an unknown molecular interaction exhibits a higher or lower rupture force (39). In both cases, one has to consider that the rupture of double-stranded DNA cannot be described accurately with the existing models for rupture forces above 65 pN. Whereas the existence of the B-S transition in short duplexes complicates the use of DNA oligonucleotides for the above-mentioned applications, it also opens up new opportunities for the analysis of the mechanism of sequence-specific DNA binders. The effects of cisplatin on the B-S transition (40) have been investigated in detail using λ -DNA. The possibility of using oligonucleotides provides control over the length and the sequence of the DNA duplex. Therefore, the number of potential binding sites of sequence-specific binders can be controlled exactly. Sequence-specific DNA binders are an important class of molecules because they can influence the DNA replication. Many of these are used for cancer therapies (41,42). The opportunity to investigate existing drugs and potential drug candidates may provide new insights into the binding mechanism to DNA and in turn provide design principles for new DNA binding molecules.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

To view all of the supplemental files associated with this article, visit www.biophysj.org.

The authors thank Angelika Kardinal for the preparation of the DNA1000s, and Gregor Neuert, Elias Puchner, Ludmila Mendelevitch, and Kay Gottschalk for helpful discussions.

This work was supported by the European Union and the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

REFERENCES

- Smith, S. B., L. Finzi, and C. Bustamante. 1992. Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA-molecules by using magnetic beads. *Science*. 258:1122–1126.
- Cluzel, P., A. Lebrun, C. Heller, R. Lavery, J. L. Viovy, D. Chatenay, and F. Caron. 1996. DNA: an extensible molecule. *Science*. 271:792–794.
- Smith, S. B., Y. J. Cui, and C. Bustamante. 1996. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*. 271:795–799.
- Wang, M. D., H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block. 1997. Stretching DNA with optical tweezers. *Biophys. J.* 72:1335–1346.
- Rief, M., H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub. 1999. Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nat. Struct. Biol.* 6: 346–349.
- Lebrun, A., and R. Lavery. 1996. Modelling extreme stretching of DNA. *Nucleic Acids Res.* 24:2260–2267.
- Lavery, R., and A. Lebrun. 1999. Modelling DNA stretching for physics and biology. *Genetica*. 106:75–84.
- Lebrun, A., and R. Lavery. 1998. Modeling the mechanics of a DNA oligomer. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 16:593–604.
- Konrad, M. W., and J. I. Bolonick. 1996. Molecular dynamics simulation of DNA stretching is consistent with the tension observed for extension and strand separation and predicts a novel ladder structure. *J. Am. Chem. Soc.* 118:10989–10994.
- Ahsan, A., J. Rudnick, and R. Bruinsma. 1998. Elasticity theory of the B-DNA to S-DNA transition. *Biophys. J.* 74:132–137.
- MacKerell, A. D., and G. U. Lee. 1999. Structure, force, and energy of a double-stranded DNA oligonucleotide under tensile loads. *Eur. Biophys. J.* 28:415–426.
- Marko, J. F. 1997. Stretching must twist DNA. *Europhys. Lett.* 38: 183–188.
- Kosikov, K. M., A. A. Gorin, V. B. Zhurkin, and W. K. Olson. 1999. DNA stretching and compression: large-scale simulations of double helical structures. *J. Mol. Biol.* 289:1301–1326.
- Rouzina, I., and V. A. Bloomfield. 2001. Force-induced melting of the DNA double helix. 1. Thermodynamic analysis. *Biophys. J.* 80:882–893.
- Rouzina, I., and V. A. Bloomfield. 2001. Force-induced melting of the DNA double helix. 2. Effect of solution conditions. *Biophys. J.* 80: 894–900.
- Williams, M. C., I. Rouzina, and V. A. Bloomfield. 2002. Thermodynamics of DNA interactions from single molecule stretching experiments. *Acc. Chem. Res.* 35:159–166.
- Clausen-Schaumann, H., M. Rief, C. Tolksdorf, and H. E. Gaub. 2000. Mechanical stability of single DNA molecules. *Biophys. J.* 78:1997–2007.
- Williams, M. C., J. R. Wenner, I. Rouzina, and V. A. Bloomfield. 2001. Entropy and heat capacity of DNA melting from temperature dependence of single molecule stretching. *Biophys. J.* 80:1932–1939.
- Williams, M. C., J. R. Wenner, I. Rouzina, and V. A. Bloomfield. 2001. Effect of pH on the overstretching transition of double-stranded DNA: evidence of force-induced DNA melting. *Biophys. J.* 80:874–881.
- Wenner, J. R., M. C. Williams, I. Rouzina, and V. A. Bloomfield. 2002. Salt dependence of the elasticity and overstretching transition of single DNA molecules. *Biophys. J.* 82:3160–3169.
- Strunz, T., K. Oroszlan, R. Schäfer, and H. J. Güntherodt. 1999. Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:11277–11282.
- Pope, L. H., M. C. Davies, C. A. Laughton, C. J. Roberts, S. J. Tendler, and P. M. Williams. 2001. Force-induced melting of a short DNA double helix. *Eur. Biophys. J.* 30:53–62.
- Bell, G. I. 1978. Models for specific adhesion of cells to cells. *Science*. 200:618–627.
- Evans, E., and K. Ritchie. 1999. Strength of a weak bond connecting flexible polymer chains. *Biophys. J.* 76:2439–2447.
- Kühner, F., J. Morfill, R. A. Neher, K. Blank, and H. E. Gaub. 2007. Force-induced DNA slippage. *Biophys. J.* 92:2491–2497.

26. Neuert, G., C. Albrecht, E. Pamir, and H. E. Gaub. 2006. Dynamic force spectroscopy of the digoxigenin-antibody complex. *FEBS Lett.* 580:505–509.
27. Blank, K., J. Morfill, and H. E. Gaub. 2006. Site-specific immobilization of genetically engineered variants of Candida Antarctica lipase B. *ChemBioChem.* 7:1349–1351.
28. Butt, H. J., and M. Jaschke. 1995. Calculation of thermal noise in atomic-force microscopy. *Nanotechnology.* 6:1–7.
29. Hugel, T., and M. Seitz. 2001. The study of molecular interactions by AFM force spectroscopy. *Macromol. Rapid Commun.* 22:989–1016.
30. Friedsam, C., A. K. Wehle, F. Kühner, and H. E. Gaub. 2003. Dynamic single-molecule force spectroscopy: bond rupture analysis with variable spacer length. *J. Phys. Condens. Matter.* 15:S1709–S1723.
31. Oesterhelt, F., M. Rief, and H. E. Gaub. 1999. Single molecule force spectroscopy by AFM indicates helical structure of poly(ethylene-glycol) in water. *N. J. Phys.* 1:1–11.
32. Kühner, F., and H. E. Gaub. 2006. Modelling cantilever-based force spectroscopy with polymers. *Polym.* 47:2555–2563.
33. Neher, R. A., and U. Gerland. 2004. Dynamics of force-induced DNA slippage. *Phys. Rev. Lett.* 93:198102.
34. Kühner, F., L. T. Costa, P. M. Bisch, S. Thalhammer, W. M. Heckl, and H. E. Gaub. 2004. LexA-DNA bond strength by single molecule force spectroscopy. *Biophys. J.* 87:2683–2690.
35. Reference deleted in proof.
36. Kühner, F., M. Erdmann, L. Sonnenberg, A. Serr, J. Morfill, and H. E. Gaub. 2006. Friction of single polymers at surfaces. *Langmuir.* 22: 11180–11186.
37. Kühner, F., M. Erdmann, and H. E. Gaub. 2006. Scaling exponent and Kuhn length of pinned polymers by single molecule force spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* 97:218301.
38. Liphardt, J., S. Dumont, S. B. Smith, I. Tinoco, and C. Bustamante. 2002. Equilibrium information from nonequilibrium measurements in an experimental test of Jarzynski's equality. *Science.* 296:1832–1835.
39. Albrecht, C., K. Blank, M. Lalic-Multhaler, S. Hirler, T. Mai, I. Gilbert, S. Schiffmann, T. Bayer, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub. 2003. DNA: a programmable force sensor. *Science.* 301:367–370.
40. Krautbauer, R., H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub. 2000. Cisplatin changes the mechanics of single DNA molecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39:3912–3915.
41. Baraldi, P. G., A. Bovero, F. Fruttarolo, D. Preti, M. A. Tabrizi, M. G. Pavani, and R. Romagnoli. 2004. DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents. *Med. Res. Rev.* 24:475–528.
42. Reddy, B. S., S. K. Sharma, and J. W. Lown. 2001. Recent developments in sequence selective minor groove DNA effectors. *Curr. Med. Chem.* 8:475–508.

Print your atomic force microscope

Ferdinand Kühner,^{a)} Robert A. Lugmaier, Steffen Mihatsch, and Hermann E. Gaub

Applied Physics and Center for Nano Science, Ludwig-Maximilians Universität München, München 80799, Germany

(Received 30 April 2007; accepted 29 May 2007; published online 9 July 2007)

Progress in scanning probe microscopy profited from a flourishing multitude of new instrument designs, which lead to novel imaging modes and as a consequence to innovative microscopes. Often these designs were hampered by the restrictions, which conventional milling techniques impose. Modern rapid prototyping techniques, where layer by layer is added to the growing piece either by light driven polymerization or by three-dimensional printing techniques, overcome this constraint, allowing highly concave or even embedded and entangled structures. We have employed such a technique to manufacture an atomic force microscopy (AFM) head, and we compared its performance with a copy milled from aluminum. We tested both AFM heads for single molecule force spectroscopy applications and found little to no difference in the signal-to-noise ratio as well as in the thermal drift. The lower E modulus seems to be compensated by higher damping making this material well suited for low noise and low drift applications. Printing an AFM thus offers unparalleled freedom in the design and the rapid production of application-tailored custom instruments. © 2007 American Institute of Physics. [DOI: 10.1063/1.2751099]

INTRODUCTION

A surprisingly wide spectrum of techniques evolved from the basic concept introduced by Binnig and Rohrer in 1986:^{1,2} scanning a probe with Angstrom precision on a sample while recording a local interaction. Boosted was this boom by the relative ease at which new ideas could be implemented in new microscopes.^{3–10} Nevertheless only a very limited range of design principles could be implemented by conventional manufacturing techniques. Here we explore and evaluate new manufacturing techniques, which not only allow entirely new topologies but also support fast and inexpensive prototyping strategies.

The most versatile implementation of the above mentioned scanned probe principle is the atomic force microscope (AFM). Due to its high resolution in force, position, and time as well as its broad range of possible ambient conditions, it opened the widest spectrum of applications. The essential part of an AFM is a sharp tip on a cantilever spring. This cantilever serves as a sensor and reacts to local interactions between the tip and the surface. Its deflection is detected by a laser beam, which is focused on the cantilever and reflected onto a segmented photodiode.¹¹

By scanning the AFM only in the z direction, vertical to the surface, it can be operated as a single molecule force spectroscopy spectrometer. While approaching and retracting the cantilever from the surface, the interaction force between the tip and the surface is recorded as a function of the separation distance. Single molecule force spectroscopy has become a very important method to analyze intra- and intermolecular interactions of biological molecules.^{7,12} The main intent is to identify the fundamental interactions in single

molecules. In recent years many intrinsic properties of single molecules were determined with this approach. For example, the entropic, enthalpic, and conformational¹³ properties of single polymers such as dsDNA,^{14–16} polysaccharides,^{17–19} and other polymers^{20–22} have been evaluated. Furthermore, the unfolding and folding pathways of proteins such as titin,^{23,24} green fluorescent protein (GFP),^{25–27} and others^{28,29} have been analyzed. Beyond intramolecular forces also intermolecular forces of different receptor-ligand systems^{30–32} have been measured, e.g., the interaction between antibody-antigen,³³ protein-dsDNA,³⁴ protein-aptamer,³⁵ and ssDNA-ssDNA,^{36–38} and also of covalent bonds.³⁹

RAPID PROTOTYPING

New techniques allow the production of the parts of an AFM head in a very fast but nevertheless very precise way. Three-dimensional (3D) printing techniques can build up complex three-dimensional structures by a layer-by-layer method. The four most favorable rapid prototyping methods are the fused deposition modeling (FDM), stereolithography (SL), laminated object manufacturing (LOM) 3D printing, and selective laser sintering (SLS).

Selective laser sintering⁴⁰ is an additive rapid manufacturing technique, which uses a high power laser to selectively fuse polymers, metal, or ceramic powders. The laser selectively smelts powdered material by tracing cross sections of the object on the surface of a powder bed with an accuracy of 100 μm . After finishing the cross section, the powder bed is lowered. Now a new layer of material is applied on top, and the process is repeated until the part is completed (see Fig. 1).

Compared with other rapid manufacturing methods, SLS can produce parts from a relatively wide range of commercially available powder materials, including polymers (ny-

^{a)}Author to whom correspondence should be addressed; electronic mail: ferdinand.kuehner@physik.uni-muenchen.de

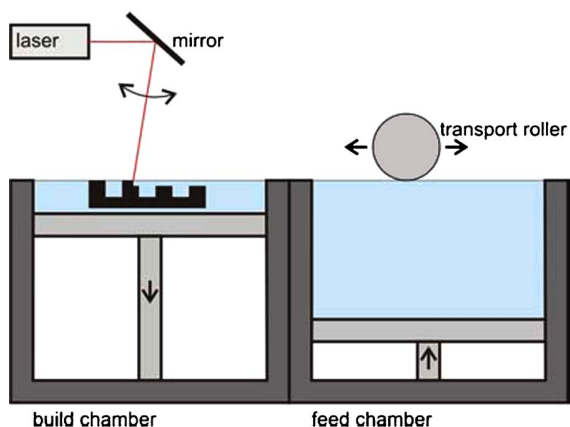


FIG. 1. (Color online) The roller spreads fine layers of powder from the feed chamber to the build chamber. A slice of the part is burned into each layer by the laser, solidifying the powder. Subsequently the process chamber is lowered and a new layer is spread. By iteration of this process, every three-dimensional structure can be printed.

lon, also glass filled or with other fillers, and polystyrene), metals (steel, titanium, alloy mixtures, and composites), and green sand. The physical process refers to full melting, partial melting, or liquid-phase sintering. Depending on the material, up to 100% density can be achieved with material properties comparable with those from conventional manufacturing methods. In many cases large numbers of parts can be packed within the powder bed, allowing a very high productivity.

PRINTING AN AFM

To evaluate the performance of a rapid prototyped AFM, we reprinted one of our aluminum AFM heads⁴¹ with the SLS method in plastic⁴² (see Material and methods). Figure 2 shows the computer aided design (CAD) design (a), the aluminum milled AFM (b), and the plastic AFM (c). To compare the noise and drift values of these AFM heads under equal conditions, the same optical and electrical components were used. The laser diode, the piezoactuator, and the photodetector were identical for the plastic printed as well as the aluminum milled AFM.

PERFORMANCE OF THE PRINTED AFM HEAD

In force spectroscopy the accuracy of the force measurement is ultimately limited by thermal noise of the cantilever. However, resonant modes of the instrument or electronic noise can worsen the sensitivity drastically.^{43–45} These disturbances of the instrument can be detected easily by measuring the power spectrum density (PSD) of the deflection of the cantilever. The noise amplitude of the deflection in the force curves is proportional to the area under the power spectrum from 0 Hz up to the corner frequency.^{46–48} The comparison of the noise in the PSD of the aluminum and the plastic AFM for a Veeco D cantilever (MLCT-AUHW, Veeco Inc., USA) in water is shown in Fig. 3. The broad peak at about 1300 Hz is the resonance of the basic vibrational mode of the cantilever. At lower frequencies the PSD should show flat white noise. Both spectra do not show any remarkable mechanical

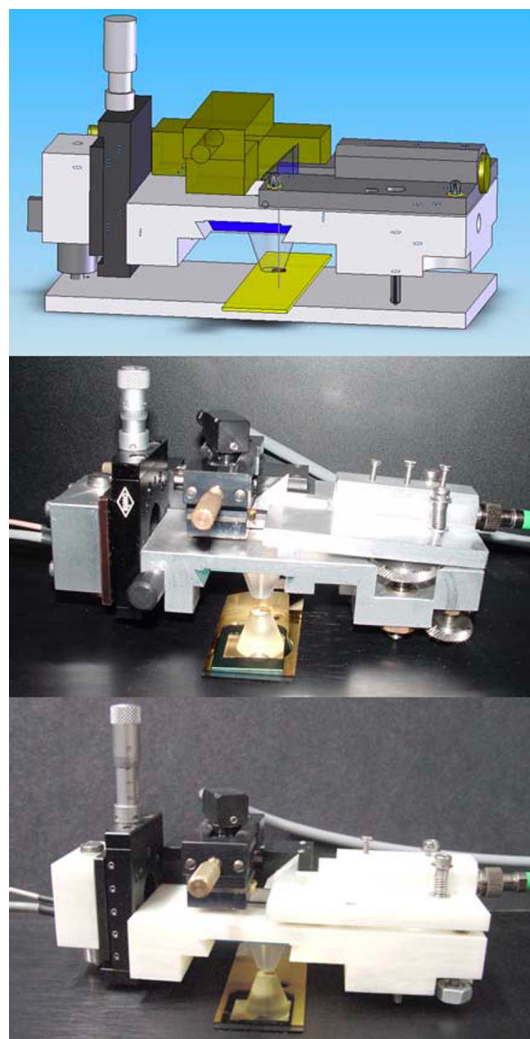


FIG. 2. (Color online) (a) shows the CAD design of the AFM, (b) the aluminum AFM, and (c) the SLS manufactured AFM.

or electrical noise. The PSD of the plastic AFM shows disturbances at frequencies of ~ 100 Hz, which are negligible due to the low amplitude. In summary, the force resolution of both the SLS and the aluminum copy is limited only by the thermal fluctuations of the cantilever and not by other noise sources of the instrument.

For a further comparison of the performance, regular force curves of both AFMs are shown in Fig. 4. A nonadhering surface was probed. Both curves show the same noise amplitude during approach and retract. These force scans have been performed with the identical cantilever⁴⁹ in both instruments and a low pass filter of 1 kHz. The retract speed of the cantilever was $1 \mu\text{m/s}$ and the sampling rate equaled 20 kHz.

Another essential parameter for the stability of an instrument is the relative distance between the surface of the sample and the base of the cantilever. In single molecule force spectroscopy applications noise in this distance leads to force fluctuations and may lower the measured unbinding forces.⁴⁸ Therefore we recorded a PSD of the cantilever in contact with the sample surface. Figure 5 shows the PSD of a D Veeco cantilever on the sample surface for the plastic and the aluminum AFM.

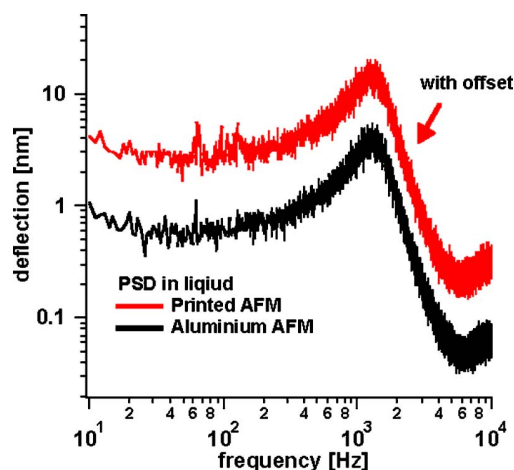


FIG. 3. (Color online) Power spectrum density of the aluminum and the plastic AFM with a Veeco D cantilever. The red (gray) trace was offset for clarity. The minor increase of the amplitude at frequencies below 3 Hz is due to mechanical modes of the building or due to drift effects because of temperature changes. Note that most published PSD graphs start at a frequency of 50 or 100 Hz and do not show the noise in the low frequency domain.

Noise peaks at around 100 Hz are prominent in both spectra. The dominating ones, which occur in both spectra, are most likely caused by piezoresonances but may also have an electronic component. The relatively sharp peaks are slightly broadened for the plastic AFM. The two additional minor peaks in the 40 Hz range and the weak peak at 150 Hz that we found for the plastic head point toward the lower E modulus of the material which shifts resonances toward lower frequencies. The broad hump at around 4 kHz is an adjustment artifact of the optics. The area under the PSD spectrum and therefore the total noise are only marginally higher for the plastic AFM than for the metal AFM.

BS TRANSITION IN λ -DNA

For extended series of measurements, the long-term drift of the instrument is a limiting factor. To demonstrate the

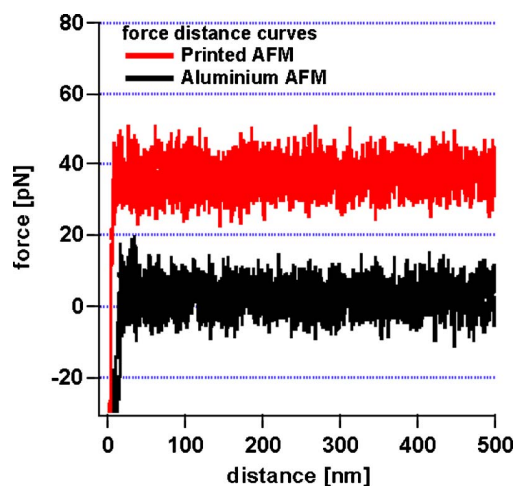


FIG. 4. (Color online) For further clearness force distance curves with the aluminum (black) and the plastic (red, gray) AFM heads are shown for a Veeco C cantilever with a retract speed of $1 \mu\text{m/s}$. Data were recorded with 20 kHz and a low pass filter of 1 kHz.

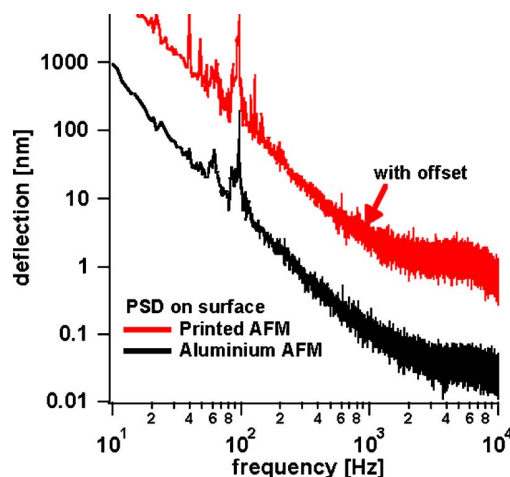


FIG. 5. (Color online) PSD for the aluminum (black) and for the plastic (red, gray) AFMs. The relatively sharp noise peaks in the aluminum AFM are broadened in the plastic AFM. The red (gray) trace was offset for clarity.

feasibility of the plastic AFM, we performed long-term measurements with biological molecules. We used λ -DNA, which is known to undergo a transition under force from its twisted B structure to a more elongated S structure. An example of such an extended series of force distance curves is given in Fig. 6. A dsDNA strand, adsorbed to a surface, was picked up with the cantilever tip and stretched in cycles. The curves show all typical features of double-stranded DNA mechanics: upon stretching first a worm-like chain (WLC) extensibility, followed by the BS transition plateau at about 65 pN, and finally the dissociation of the strands at 200 pN. Upon relaxation the DNA contracts as ssDNA and finally reanneals with its complementary strand.

In this experiment we recorded over 800 force curves of the very same DNA, without detaching it once! As can be seen in Fig. 6, curve 650 is virtually indistinguishable from the first one. This demonstrates very convincingly that the

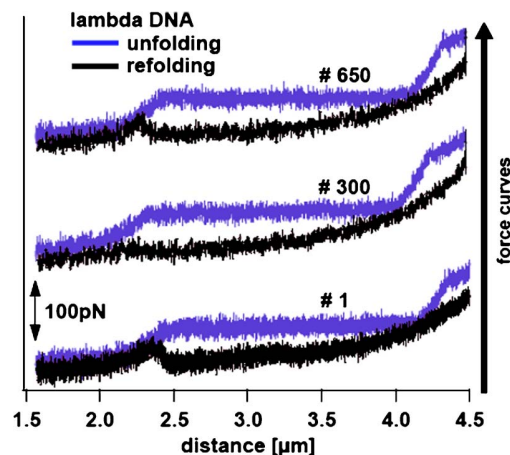


FIG. 6. (Color online) Series of force curve of dsDNA recorded at $1 \mu\text{m/s}$ and low pass filtered at 1 kHz. (Veeco C cantilever, spring constant of 15 pN/nm). At an applied force of about 65 pN, the DNA undergoes the transition from its B form to its S form, which results in a lengthening of the total DNA polymer. Note that scan 650 is virtually indistinguishable from the first scan!

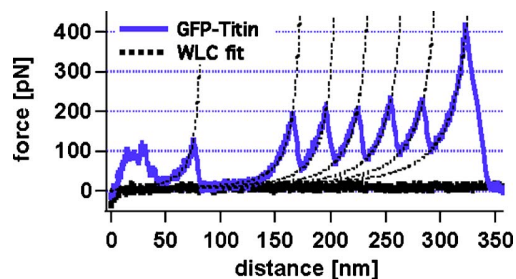


FIG. 7. (Color online) The force curves display the unfolding of GFP Titin. Under an applied force the GFP unfolds first, followed by the individual Titin domains. This results in a lengthening of one 72 nm (GFP) and several 32 nm (Titin) steps of the total molecule. The black dashed lines are the WLC fits with evenly length differences of exactly 72 and 32 nm. The force curve was recorded with a C Veeco cantilever at a retrace speed of 500 nm/s. The sampling rate was 5 kHz with a low pass filter of 1 kHz.

plastic AFM head has superb long-term stability, particularly a very low drift in the relative distance of the cantilever base and the surface with the sample.

UNFOLDING OF GFP-TITIN

Another proof of principal for an application of the plastic AFM is the unfolding experiment of a single protein. A very well analyzed protein, regarding its unfolding path and unfolding force, is the GFP⁵⁰ Titin fusion protein. The protein is a tandem construct of four Ig domains, one GFP protein and another four Ig domains. Under force, the GFP protein unfolds first, followed by the individual Ig domains. Figure 7 shows the typical fingerprint of such an unfolding force curve. In this case only six Ig domains were unfolded.

DISCUSSION

The force resolution of the printed plastic AFM head and the conventional AFM head turned out to be comparable. In terms of long-term drift, the printed AFM performed favorably, presumably because of the lower expansion coefficient of plastic. The plastic head is clearly not as durable as the metal instrument; threads have a limited lifetime and the solvent resistance is finite. But this very cost efficient rapid prototyping approach offers in turn a quasi-instant realization of new design ideas and allows us to test and evaluate a wide range of novel conceptual options. This approach promises innovative means to explore new AFM operation modes, particularly in combination with other high resolution techniques such as single molecule optics, patch clamps, and alike.

MATERIALS AND METHODS

Design of the printed AFM

The design of the printed pieces was done in Solidworks software (Solidworks Inc., Concord, Mass., U.S.A.). The interface of the rapid prototyping machines refers to the standard triangulation language format.⁵¹

Adjustments with micrometer precision were implemented by fine screws with threaded bushings, which are pressed in holes. Other screws threads were cut manually. All

other features can be done precisely enough with the printer. All rapid prototype pieces were printed by Prototypen-Zentrum in Dresden.

Data acquisition

The laser-photodiode signal and the piezostain gauge feedback were read in via a “DT 3016” data acquisition card for personal computer (PC) (Data Translation, Germany). The data were recorded with the “MFP-1D” procedures (Asylum Research) for the “IGOR PRO” data analysis software (Wavemetrics Inc., Lake Oswego, Oregon, U.S.A.). The sampling frequency was 20 kHz, whereas the DNA and GFP-Titin force curves had a 1 kHz software filtering.

Lambda DNA preparation

λ -DNA *BstE* II Digest (Sigma-Aldrich) was diluted in TEN buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 8.0) to a concentration of 1.50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A droplet of 50 μl was spotted on a gold-coated slide and allowed to evaporate. AFM measurements were then performed with an untreated silicon nitride cantilever in TEN buffer.

GFP-Titin preparation

GFP-Titin was diluted with phosphate buffered saline (PBS) to a concentration of 5 mg/ml and allowed to bind to a gold-coated slide for about 10 min. AFM measurements were performed with an untreated silicon nitride cantilever.

- ¹G. Binnig and H. Rohrer, IBM J. Res. Dev. **30**, 355 (1986).
- ²G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, Phys. Rev. Lett. **56**, 930 (1986).
- ³K. Unal, J. Frommer, and H. K. Wickramasinghe, Appl. Phys. Lett. **88**, 183105 (2006).
- ⁴Y. Martin and H. K. Wickramasinghe, Appl. Phys. Lett. **64**, 2498 (1994).
- ⁵F. J. Giessibl, Rev. Mod. Phys. **75**, 949 (2003).
- ⁶P. Vettiger *et al.*, IEEE Trans. Nanotechnol. **1**, 39 (2002).
- ⁷H. J. Butt, B. Cappella, and M. Kappl, Surf. Sci. Rep. **59**, 1 (2005).
- ⁸H. K. Wickramasinghe, Acta Mater. **48**, 347 (2000).
- ⁹L. Riemenschneider, S. Blank, and M. Radmacher, Nano Lett. **5**, 1643 (2005).
- ¹⁰P. Frederix, T. Akiyama, U. Stauffer, C. Gerber, D. Fotiadis, D. J. Muller, and A. Engel, Curr. Opin. Chem. Biol. **7**, 641 (2003).
- ¹¹S. Alexander, L. Helleman, O. Marti, J. Schneir, J. Elings, P. K. Hansma, M. Longmire, and J. Gurley, J. Appl. Phys. **65**, 164 (1989).
- ¹²A. Janshoff, M. Neitzert, Y. Oberdorfer, and H. Fuchs, Angew. Chem., Int. Ed. **39**, 3213 (2000).
- ¹³F. Kühner, M. Erdmann, and H. E. Gaub, Phys. Rev. Lett. **97**, 218301 (2006).
- ¹⁴H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf, and H. E. Gaub, Biophys. J. **78**, 1997 (2000).
- ¹⁵S. Cui, C. Albrecht, F. Kühner, and H. E. Gaub, J. Am. Chem. Soc. **128**, 6636 (2006).
- ¹⁶M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H. E. Gaub, Nat. Struct. Biol. **6**, 346 (1999).
- ¹⁷P. E. Marszalek, H. B. Li, and J. M. Fernandez, Nat. Biotechnol. **19**, 258 (2001).
- ¹⁸M. Rief, F. Oesterhelt, B. Heymann, and H. E. Gaub, Science **275**, 1295 (1997).
- ¹⁹H. B. Li, M. Rief, F. Oesterhelt, H. E. Gaub, X. Zhang, and J. C. Shen, Chem. Phys. Lett. **305**, 197 (1999).
- ²⁰T. Hugel, M. Rief, M. Seitz, H. E. Gaub, and R. R. Netz, Phys. Rev. Lett. **94**, 048301 (2005).
- ²¹T. Hugel, N. B. Holland, A. Cattani, L. Moroder, M. Seitz, and H. E. Gaub, Science **296**, 1103 (2002).
- ²²F. Oesterhelt, M. Rief, and H. E. Gaub, New J. Phys. **1**, 6 (1999).
- ²³M. Rief, M. Gautel, F. Oesterhelt, J. M. Fernandez, and H. E. Gaub, Science **276**, 1109 (1997).

- ²⁴A. F. Oberhauser, P. K. Hansma, M. Carrion-Vazquez, and J. M. Fernandez, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 468 (2001).
- ²⁵S. Kufer, H. Dietz, C. Albrecht, K. Blank, A. Kardinal, M. Rief, and H. Gaub, *Eur. Biophys. J.* **35**, 72 (2005).
- ²⁶H. Dietz and M. Rief, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 1244 (2006).
- ²⁷I. Schwaiger, M. Schleicher, A. A. Noegel, and M. Rief, *EMBO Rep.* **6**, 46 (2005).
- ²⁸R. K. Ainavarapu, L. W. Li, and J. M. Fernandez, *Biophys. J.* **91**, 2009 (2006).
- ²⁹T. Bornschlogl and M. Rief, *Phys. Rev. Lett.* **96**, 118102 (2006).
- ³⁰P. Hinterdorfer, W. Baumgartner, H. J. Gruber, K. Schilcher, and H. Schindler, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 3477 (1996).
- ³¹E. L. Florin, V. T. Moy, and H. E. Gaub, *Science* **264**, 415 (1994).
- ³²G. U. Lee, D. A. Kidwell, and R. J. Colton, *Langmuir* **10**, 354 (1994).
- ³³R. Ros, F. Schwesinger, D. Anselmetti, M. Kubon, R. Schafer, A. Pluckthun, and L. Tiefenauer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7402 (1998).
- ³⁴F. Kühner, L. T. Costa, P. M. Bisch, S. Thalhammer, W. M. Heckl, and H. E. Gaub, *Biophys. J.* **87**, 2683 (2004).
- ³⁵C. Friedsam, A. K. Wehle, F. Kuhner, and H. E. Gaub, *J. Phys.: Condens. Matter* **15**, S1709 (2003).
- ³⁶T. Strunz, K. Oroszlan, R. Schafer, and H. J. Guntherodt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11277 (1999).
- ³⁷R. Krautbauer, M. Rief, and H. E. Gaub, *Nano Lett.* **3**, 493 (2003).
- ³⁸F. Kühner, J. Morfill, R. Neher, R. Blank, and H. Gaub, *Biophys. J.* **92**, 2491 (2007).
- ³⁹M. K. Beyer and H. Clausen-Schaumann, *Chem. Rev. (Washington, D.C.)* **105**, 2921 (2005).
- ⁴⁰SLS®, a registered trademark of 3D Systems, Inc.
- ⁴¹R. A. Lugmaier, T. Hugel, M. Benoit, and H. E. Gaub, *Ultramicroscopy* **104**, 255 (2005).
- ⁴²Parts were printed by the company Prototypen Zentrum Dresden, G.
- ⁴³M. B. Viani, T. E. Schaffer, A. Chand, M. Rief, H. E. Gaub, and P. K. Hansma, *J. Appl. Phys.* **86**, 2258 (1999).
- ⁴⁴AsylumResearch, www.asylumresearch.com
- ⁴⁵T. E. Schaffer, *Nanotechnology* **16**, 664 (2005).
- ⁴⁶H. J. Butt and M. Jaschke, *Nanotechnology* **6**, 1 (1995).
- ⁴⁷Translating the interactions of the analyzed systems from a regular force curve in the frequency room shows that the frequencies are lower than 1–10 kHz, dependent on the system (spacer length) and the retract speed of the cantilever. Therefore, the acquired data can be filtered with a low pass filter, which optimizes the signal-to-noise ratio in a certain bandwidth.
- ⁴⁸F. Kuhner and H. E. Gaub, *Polymer* **47**, 2555 (2006).
- ⁴⁹Veeco C cantilever (spring constant=15 pN/nm).
- ⁵⁰GFP Green fluorescent protein.
- ⁵¹Files (.stl) online available: www.biophysik.physik.uni-muenchen.de

Dynamic restacking of *Escherichia Coli* P-pili

Robert A. Lugmaier · Staffan Schedin ·
Ferdinand Kühner · Martin Benoit

Received: 28 February 2007 / Revised: 27 April 2007 / Accepted: 7 May 2007 / Published online: 7 June 2007
© EBSA 2007

Abstract P-pili of uropathogenic *Escherichia coli* mediate the attachment to epithelial cells in the human urinary tract and kidney and therefore play an important role in infection. A better understanding of this mechanism could help to prevent bacteria from spreading but also provides interesting insights into molecular mechanics for future nanotech applications. The helical rod design of P-pili provides an efficient design to withstand hydrodynamic shear forces. The adhesive PapG unit at the distal end of the P-pilus forms a specific bond with the glycolipid Galabiose. This bond has a potential width $\Delta x = 0.7 \pm 0.15$ nm and a dissociation rate $K_{\text{Off}} = 8.0 \cdot 10^{-4} \pm 5.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. It withstands a force of ~ 49 pN under physiological conditions. Additionally, we analyzed the behavior of unstacking and restacking of the P-pilus with dynamic force spectroscopy at velocities between 200 and 7,000 nm/s. Up to a critical extension of 66% of the totally stretched P-pilus, un/re-stacking was found to be fully reversible at velocities up to 200 nm/s. If the P-pilus is stretched beyond this critical extension a characteristic hysteresis appears upon restacking. This hysteresis originates from a nucleation process comparable to a first-order phase transition in an under-cooled liquid. Analysis of the measurement data suggests that 20 PapA monomers are involved in the formation of a nucleation kernel.

Keywords Atomic force microscope (AFM) · Force spectroscopy · P-pilus · Restacking · *Escherichia Coli* · PapA

Introduction

Latest research shows, that the healthy human body is colonized by up to ten times more external cells i.e. prokaryotes or bacteria, than it consists of somatic cells (Gill et al. 2006). The greater part lives in a symbiotic relation with the eukaryotic organism and therefore provides abilities, from which the human body benefits. This can be the synthesis of amino acids and vitamins out of otherwise indigestible constituents of our nutrition (Gill et al. 2006). *Escherichia coli* cells in the intestinal tract can change from symbiotic to pathogenic if entering the urinary tract. These *E. coli* cells then cause infections (inflammation) and severe pyelonephritis.¹ The extraintestinal infections by *E. coli* often are an underestimated threat causing not only symptoms, which can be cured easily, but also severe diseases with mortality and additionally great economical damage (Russo and Johnson 2003). The understanding of the mechanism of attachment and infection of human epithelial cells by *E. coli* therefore is an important issue for scientists of several subjects.

The P-pili presented in this work are fimbria or hair-like structures expressed on uropathogenic *E. coli* cells, which mediate adhesion to the host tissue. Besides the biological relevance, P-pili show a complex behavior upon stretching and relaxing, which is examined in this work. Its mechanical properties might also be of use as a device in a

R. A. Lugmaier (✉) · F. Kühner · M. Benoit
Lehrstuhl für Angewandte Physik und Center for NanoScience,
Ludwig-Maximilians-Universität München,
Amalienstrasse 54, 80799 Munich, Germany
e-mail: Lugmaier@lmu.de
URL: <http://www.biophysik.physik.uni-muenchen.de>

S. Schedin
Department of Applied Physics and Electronics,
Umeå University, 90187 Umeå, Sweden

¹ Pyelonephritis = upper urinary tract and kidney infection.

future nanoscale “toolbox” (Li et al. 2000; Sharma et al. 2006). P-pili are formed by a chaperone-usher pathway in the periplasm of the *E. coli* cell (Bullitt et al. 1996; Sauer et al. 1999, 2002; Vetsch et al. 2004). The P-pili of uropathogenic *E. coli* consist of ca. 1,000 immunoglobulin-like units, so called PapA², forming a helical rod (Jiang et al. 2002) (Fig. 1a). At the distal end of the rod resides a tip fibrillum made of one PapK, about 50 PapE units, one PapF and one PapG adhesin which mediates the specific binding to globoseries glycolipids (Galabiose) (Larsson et al. 2003; Lindberg et al. 1984; Lund et al. 1987; Ohlsson et al. 2002) present on human epithelial cells. The P-pilus is anchored to the bacterial cell with a PapH pilin. Except PapG, all Pap-units are quite similar with a molecular mass of about 16,500 Da. The existent strong but non-covalent interactions (hydrogen bonds, hydrophobic interactions) between the subunits n and $n + 1$ result from “domain swapping” (Mu and Bullitt 2006). Thereby the n -terminal β -sheet of the n -th subunit binds into the “hydrophobic groove” of the $n + 1$ st subunit. This “hydrophobic groove” results from the lack of the seventh c-terminal β -strand of the Ig-like fold (Sauer et al. 2002). In the PapA rod the subunits additionally bind between the n and $n + 3$ rd unit which leads to the rigid helical rod formation (Mu et al. 2005). The right-handed quaternary helical rod has a length of about 1,000 nm and a diameter of 8.2 nm. One turn consists of 3.28 PapA units with an inclination of 2.47 nm (0.754 nm per monomer). The PapA monomer has a molecular weight of 16.5 kDa, a length of 4.1 nm and a diameter of 2.5 nm (Bullitt and Makowski 1998; Mu and Bullitt 2006). Because of the linear alignment of monomers in the tip fibrillum, it has a diameter of 2.5 nm.

To understand the evolutionary developed answers of P-pili to hydrodynamic shear force, mechanical manipulations under well-defined experimental conditions are of great importance. As shown before with Optical Tweezers (OT) experiments, the stretching basically is elastic and therefore reversible (Andersson et al. 2006c). Besides other techniques, the atomic force microscope (AFM) (Binnig et al. 1986; Bippes et al. 2006; Grandbois et al. 1999, 2000) has proven to investigate mechanical properties of living cells (Benoit et al. 1997; Zhang et al. 2006). This work reports on force spectroscopy measurements on P-pili with the AFM. About 70 stretching and relaxing cycles could be measured on one single molecule. The restacking-process of P-pili, present in characteristic force-curves, was the focus of our interest. We discuss the process as a first-order phase transition. Furthermore, with force spectroscopy experiments, we were able to directly measure the failure force of the specific Galabiose-PapG bond. Molecular bonds can be described by the potential of a certain width

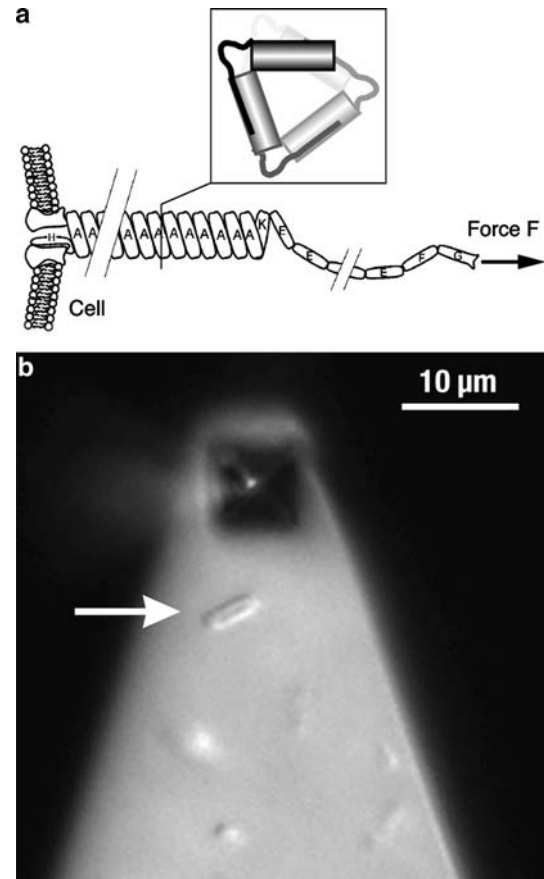


Fig. 1 **a** Structure of an *E. coli* P-pilus [derived from Jass et al. (2004)]. The P-pilus consists of ca. 1,000 PapA units forming a helical rod with a length of about 1,000 nm and a diameter of 8.2 nm. At the distal end resides a non-stacked tip fibrillum consisting of one PapK, ca. 50 PapE, one PapF and one PapG protein. The PapG protein specifically recognizes the glycolipid Galabiose present on human epithelial cells. *Inset* Cross section (derived from Mu and Bullitt (2006)). The units are connected via “domain swapping”. **b** Quasi-Trans DIC image of *E. coli* cells on a glass substrate positioned below the reflecting AFM-cantilever (unsharp edges because out of focus). Quasi-Trans DIC microscopy allows high-resolution optical imaging below a reflective surface (here the cantilever). The cell (arrow) and the very top of the pyramidal tip are in focus. For the measurements the single cell was translocated to directly get into contact with the cantilever tip

and depth. According to the Bell-Evans model, the dissociation rate increases with the potential width Δx and with an applied force $F(t)$ (Evans and Ritchie 1997, 1999). Based on this theory and the characteristic distribution of the measured failure forces we will determine the natural dissociation rate K_{off} and the potential width Δx for the PapG-Galabiose bond by a Monte Carlo simulation (Friedsam et al. 2003). A unique feature in this work is the combination of the AFM with a high-resolution light microscopy technique that allows us to select very precisely an individual bacterial cell for the force spectroscopy measurement (Fig. 1b).

² Pap = Protein associated with pyelonephritis.

Materials and methods

Substrate- and cantilever-functionalization

The Si_3N_4 AFM-cantilevers (MLCT-AUHW, Veeco Inc., Santa Barbara, CA, USA) were thoroughly cleaned in ethanol and dried at 80°C. They were incubated in pure aminosilane (N^1 -[3-(Trimethoxysilyl)-propyl-diethylenetriamine], Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, Germany) at 80°C for 10 min, rinsed with ethanol and baked in water at 80°C for 1 h. Then carboxymethylamylose (CMA, Sigma-Aldrich) was covalently bound to the aminosilane via EDC/NHS (1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbamide/N-Hydroxysuccinimide, Sigma-Aldrich) activation. For the studies of the specific receptor-ligand interaction of PapG to Galabiose, Amino-Galabiose (2 mM, $\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{NO}_{11}$) (Ohlsson et al. 2002) was covalently coupled to the activated CMA on the cantilever. For the restacking experiments the activated CMA cantilever was directly used to bind to a pilus.

To make full use of the optical resolution of the AFM-Hybrid (see below), the measurements were performed in homemade glass-bottom Petri dishes. Round cover glasses (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany) with a thickness of 0.17 mm were silanized and functionalized with CMA as described for the cantilevers. After drying the cover glasses in a nitrogen flow, they were glued onto a hole punched into a commercially available plastic Petri dish (Nunc, Roskilde, Denmark).

Bacteria and culture conditions

P-pili were expressed in recombinant derivatives of the otherwise afimbriated *E. coli* HB101.

The plasmid pPAP5 carries the entire Pap gene cluster on the vector pBR322 and expresses normal P-pili. The pPAN5 carries a mutant Pap gene cluster which expresses fewer PapA subunits and therefore shorter P-pili (Lindberg et al. 1984). The HB101/pPAP5 *E. coli* bacteria were cultured on tryptic soy agar (TSA, Sigma-Aldrich), supplemented with 50 µg/ml carbenicillin (Sigma-Aldrich). Shortly before the AFM measurements the cells were resuspended in phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS, Sigma-Aldrich).

AFM experiments

The force spectroscopy experiments were performed with an AFM-optical microscope hybrid-instrument described in Lugmaier et al. (2005). This instrument consists of a 1D-AFM head placed on top of an inverted microscope. With a magnification up to the Abbe diffraction limit and high

vibration damping, this setup combines high-resolution optical microscopy and high-resolution force spectroscopy.

A droplet (40 µl) of suspended cells was put on the EDC/NHS re-activated cover glass. The cells were allowed to settle for 30 min and to bind covalently via their amino-groups to the Carboxymethylamylose. After rinsing carefully, we added fresh PBS buffer for the measurements. After the preparation the cells were used for about 2 h. With the use of the Quasi-Trans DIC technique (Lugmaier et al. 2005) and an exactly tunable x-y-stage we were able to place a single *E. coli* cell directly under the tip of the AFM-cantilever (see Fig. 1b). After this alignment, the cantilever was brought into contact with the cell at contact forces lower than 100 pN and a contact time of 3 s to allow the pili to bind. Galabiose-functionalized cantilevers were used to record the interaction with PapG located at the very end of each pilus. Force-distance curves were recorded at 500 nm/s. In control experiments this interaction was blocked by adding 2 mM soluble Galabiose ($\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_{12}$). For the dynamical restacking experiments force-distance curves were recorded at velocities in the range between 200 and 7,000 nm/s. The elongation of pili of different lengths was modulated at varied extensions. With the Igor Pro Software (Wavemetrics Inc., Lake Oswego, Oregon, USA) the curves were recorded (20 kHz sampling frequency; 10 kHz filtering) and analyzed (smoothed force curves: box-smoothing, box size 51).

Monte Carlo simulation

The bound state of a receptor ligand interaction can be described using a potential well, which can be left with a certain probability. This unbinding process is driven by thermal fluctuations. According to the Bell–Evans model, mechanical loading of the bond deforms the energy landscape. Hence, the probability for dissociation under an applied force $F(t)$ depends on the natural dissociation rate K_{off} but also on the potential width Δx (Evans and Ritchie 1997, 1999):

$$K_{\text{off}}(F) = K_{\text{off}} \cdot \exp(F \cdot \Delta x / k_B \cdot T).$$

The thermal fluctuations lead to a characteristic distribution of the measured failure force F of every molecular bond if this bond is loaded with force by the AFM cantilever at a certain retraction velocity v . The Monte Carlo simulation computes the dissociation probability $P(F) = K_{\text{off}}(F) \cdot \Delta t$ (with $\Delta t = \Delta z / v$ = sampling interval divided by the separation velocity) (Rief et al. 1997a). A master force curve was constructed, which exactly reproduces the force profile when stretching a pilus (compare Fig. 2a). To consider the different pili lengths, the unbinding events are weighted according to their occurrence in the experiment to scale a

representative master curve. The simulation is performed by calculating the dissociation probability $P(F)$ for every point (interval Δz) on the force profile. Δt is the time scale of the applied force F . $P(F)$ is compared with a random number between zero and one. If $P(F)$ is larger than this random number, the corresponding force equals the unbinding force and the next run starts. For further details see the introduction of this method in Friedsam et al. (2003). The obtained distribution is plotted together with the histogram of the measured rupture forces, which is a summation over three experiments (Fig. 4b). By varying the intrinsic values K_{off} and Δx , the dissociation probability function $P(F)$ is fitted to the rupture force histogram. This method is applied to the measured data recorded at a single retract velocity and not only considers the maxima of the histograms but also its shape.

Experimental results

Unstacking and restacking dynamics

Figure 2a shows a typical force versus extension curve of a single P-pilus. The *E. coli* cell that expresses the pilus was bound to a carboxylated surface. The pilus is picked up unspecifically with the AFM-cantilever and can be stretched up to fivefold of its length until rupture or detachment. One can easily distinguish three major regions (compare Jass et al. (2004)): Region I refers to the first rise (sometimes with a starting peak) where the first unstacking of the PapA units occurs. Region II shows a further unstacking of the helical rod, which leads to a constant force plateau at about 27 pN. Finally region III shows a second plateau and a drastic increase of the force due to an elastic stretching of the pilus (i.e. a molecular chain). The particular shape of the force curve throughout regions I–III and the constant level of ~27 pN at the plateau in region II provide a unique “fingerprint” that is used to distinguish single pili attachments from multiple bonds. By stopping the cantilever movement before a rupture event and by subsequently decreasing the tip–surface distance, the pilus is able to restack by reorganizing its helically stacked structure. The typical trace shown in Fig. 2b shows that the restacking is exactly the same as the unstacking path, except for the hysteresis which occurs before re-entering the constant force plateau in region II (in a few cases additional areas with hysteresis occur, see below). At the hysteresis region in the relaxation curve the tension in the pilus is reduced down to 17 pN. Next, a steep increase in force up to the first plateau marks the end of the hysteresis. It seems that a restacking seed had to be formed. Further relaxation exactly follows the former unstacking plateau

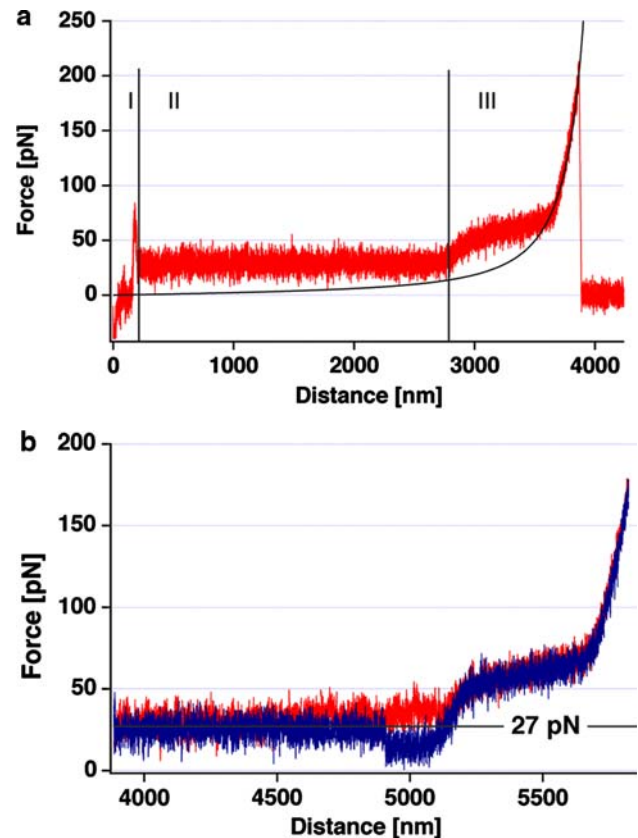


Fig. 2 **a** Force versus elongation plot of one single pilus, adhering nonspecifically to the tip, measured at a velocity of 500 nm/s. Region I (initial unstacking), II (unstacking plateau at a force of 27 pN) and III (further stretching until the rupture event occurs) are indicated in the figure. *Black Curve* WLC fit to the final elongation (Persistence length $L_p = 0.78$ nm, Contour length $L_c = 4212$ nm). **b** Force versus elongation plot of one single pilus ranging from region II into region III (red). The relaxation curve (blue) shows the characteristic hysteresis. The measurement was performed at a velocity of 500 nm/s

at the same equilibrium force of 27 pN. This un-/restacking force curve can be reproduced repeatedly until the pilus finally separates from the tip. This final separation curve reveals whether it was a single-pilus experiment. If other pili would remain connected to the tip, the first force-plateau would show additional steps to multiples of 27 pN.

Figure 3 shows a set of 70 restacking curves of one and the same single pilus at eight different velocities between 200 and 7,000 nm/s. Curves recorded at the same velocities are pooled. To obtain these curves, the pilus was bound unspecifically to the tip of the AFM cantilever. This attachment holds forces up to 250 pN and therefore allows the recording of several stretching and relaxing cycles without detachment of the pilus. We define the length l of the hysteresis (according to Fig. 3) between the reference point P (red circle) and the beginning of the abrupt rise to the restacking plateau. At the velocity of 200 nm/s, P is the

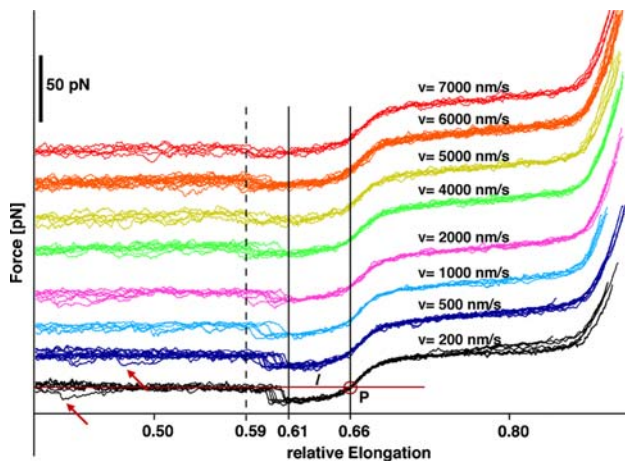


Fig. 3 Velocity dependent force curves of one single pilus. Restacking is limited by a spatial barrier, which leads to a minimum hysteresis length of 270 nm. The X-axis shows the relative elongation of the pilus with respect to its contour length L_c (see WLC fit in Fig. 2a). Longest restacking-events occur at $0.59 L_c$ (dashed y-line), shortest at $0.61 L_c$ (solid y-line). P marked by a red circle, represents the intersection of the line-fit of the plateau with the decreasing part of the restacking curve and is equivalent to the critical elongation point. This fixed point P is located at $0.66 L_c$ (solid y-line). The value “ l ” indicates the length of the hysteresis, measured from P to each restacking step. Arrows indicate drops within the restacking plateau with a similar shape like the hysteresis plateaus

intersection of the line fit to the plateau with the steep force slope between the hysteresis and the second plateau. Interestingly, our measurements show, that this point P marks another decisive behavior: If stretching of the pilus is reversed before passing this “critical extension” of 66% of the total contour-length (point P), the restacking precisely follows the unstacking pathway without showing any hysteresis. In contrast, if the pilus is stretched beyond this point P , the hysteresis appears in the relaxing force curve. Furthermore, we found that the shape of the region to the right of the reference point P is conserved even under different velocities for all curves [compare Andersson et al. (2006b)]. In Fig. 3 the curves are aligned in the x-direction at the point P . The curves recorded at 200 nm/s thereby serve as template for the alignment. This alignment assures the measure of the hysteresis length l independent of hydrodynamic effects of the cantilever. Moreover, when relaxing the pilus at higher cantilever speeds the constant force plateau is lowered due to limited restacking kinetics (see Discussion).

An analysis of the hysteresis length l shows, that it ends in the range of 59–61% of the contour length L_c for all velocities (Fig. 3). The refolding step is flattened at higher velocities but the hysteresis is still recognizable after computer processing of the data (noise filtering and compressing the curve in x-direction). The slope of the step at the end of the hysteresis up to the stacking plateau varies

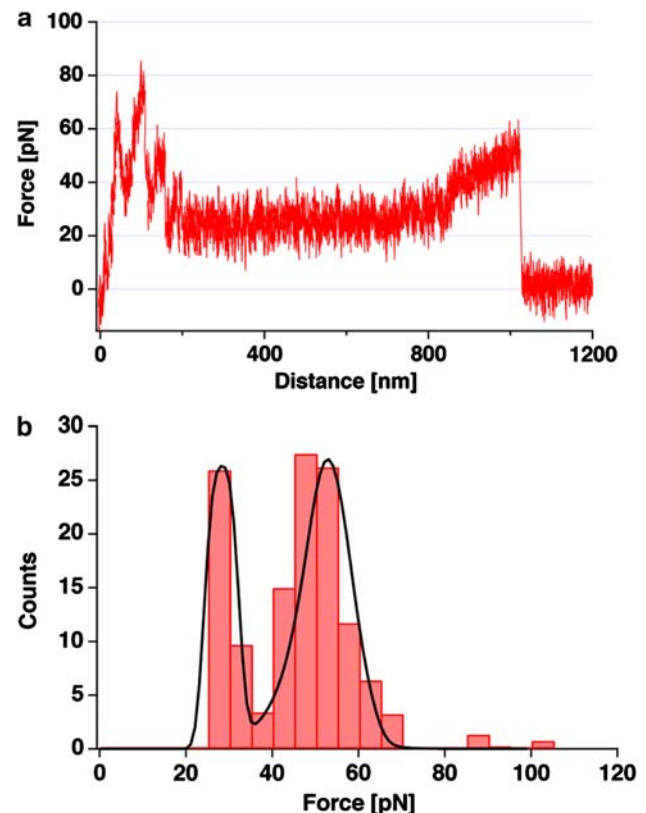


Fig. 4 a Typical force–distance plot of the opening of a Galabiose–PapG bond (here 44 pN). b Force histogram of all measured rupture events of Galabiose–PapG bonds. The histogram reveals most probable rupture forces of 27 and 49 ± 3 pN. By varying the intrinsic values K_{off} and Δx , the dissociation probability function $P(F)$ can be adjusted to equal the measured rupture force histogram. The black solid line shows the best Monte Carlo fit with a dissociation rate $K_{off} = 8.0 \cdot 10^{-4} \pm 5.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and a potential width $\Delta x = 0.7 \pm 0.15 \text{ nm}$

with different cantilever velocities. Through normalization with respect to time, one obtains a constant value for the “speed for the initiation of restacking” of $18 \pm 1 \text{ nm/s}$ for all recorded curves.

Specific PapG-Galabiose bond

Figure 4a shows a typical force-curve with a specific interaction between Galabiose and PapG. The detachment forces obtained from three experiments are shown in the histogram in Fig. 4b and reveal a bimodal distribution with peaks at 27 and 49 ± 3 pN, which refer to the most probable rupture forces. The adhesion dropped below the detection limit if soluble Galabiose was added, which corroborates the specificity of this interaction. A probability dissociation function can be computed by a Monte Carlo simulation (Evans and Ritchie 1997, 1999) (see Materials and methods). Fitting this function to the experimental results, by varying the intrinsic values K_{off}

and Δx (black solid line in Fig. 4b) yielded a dissociation rate $K_{\text{Off}} = 8.0 \cdot 10^{-4} \pm 5.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and a potential width $\Delta x = 0.7 \pm 0.15 \text{ nm}$ for the PapG-Galabiose complex.

Theory

Model for dynamic restacking

In agreement with other models we assume that the pilus is partially stacked with an angle of 13° between the subsequent units (Bullitt and Makowski 1995; Mu and Bullitt 2006). A nucleation force (region I at the beginning of the elongation force curve, Fig. 2a) is needed to first break up the stacking of the PapA units somewhere in the pilus. Now the PapA units can subsequently unstack at an equilibrium force of $27 \pm 3 \text{ pN}$ in a process, which can be discussed in analogy to a phase transition. It is assumed, that the unstacking force results from the opening of the bond between the n -th and the $n + 3$ rd subunit (Andersson et al. 2006a). This force tends to pull the PapA units back into the stacked conformation in equilibrium with a force stretching the angle between the unstacked units. Andersson et al. (2006a) suggest a “strain-assisted bond-opening” for the pilus elongation in their modified “sticky chain” model (Jager 2001). At the critical extension of 66% all the stacked units are opened and the force increases to the second plateau where the units are forced to overcome a steric hindrance by deforming their tertiary structure (Thomas et al. 2002). This deformation must be faster than the unstacking process, because it does not show any structural hysteresis even at high velocities as $2 \mu\text{m/s}$ (except hydrodynamics of the cantilever). On further stretching of the pilus (the angles between the units become close to 180°) the typical pattern of a worm like chain (Rief et al. 1997b) fits to the slope until the rupture event occurs (Fig. 2a).

The nucleation process required to initiate restacking

We assume that a nucleation process triggers the steep step at the end of the hysteresis upon relaxing the pilus. This step establishes the initial stacking of PapA units and requires a relaxation to at least 0.61 contour length L_c (Fig. 3). The latest steps towards restacking occur at a length of $0.59 L_c$ of the relaxing pilus (when taking into account all the curves of the complete set of velocities). As soon as this stacking is established it obviously stabilizes an equilibrium force between the units, which equals the unstacking force of the plateau and might act as a seed for the unstacked units to join the stacking. Comparable to undercooled liquids, formation of a nucleation kernel of critical size (independent of the liquids volume) initiates first-

order phase transitions. In analogy to this, a nucleation kernel for restacking might be detected by comparing pili of different lengths. Therefore, we compare relaxation curves of pili of different lengths by scaling them to a normalized length. To obtain the most precise results we took only measurements at the same velocity of 200 nm/s into account since the variation in hysteresis length is smallest at this velocity (see Fig. 3). An arbitrary pilus restacking force curve was defined as a reference for a standard pilus length (e.g. black curve in Fig. 5). Each curve from pili with different lengths can be scaled to this standard by an individual scaling factor k in order to superimpose the conserved part. This conserved part spans from the maximum extension through the second plateau down to the beginning of the restacking hysteresis at the reference point P. Its length L was used to determine the scaling factor $k = L_0/L$, where L_0 is the conserved length of the reference standard pilus. This classification is reasonable, since already in Fig. 3 the conserved part could be identified, while the length of the hysteresis plateau varies. As expected for a pilus trying to restack like in a situation comparable to an undercooled liquid, the initial step to start restacking is very sensitive to the statistical kicks due to the Brownian Motion. Therefore, the hysteresis lengths l do not superimpose exactly, as shown in Fig. 3 even within the same pilus. But interestingly the average of the longer pili exhibits shorter hysteresis l' after the scaling and vice versa (see Fig. 5). A reason for this could be an unknown structure of a length a_0 in each restacking hysteresis, which is constant and independent of the pili's lengths. On this basis we define the plateau length of the hysteresis for the standard pilus as:

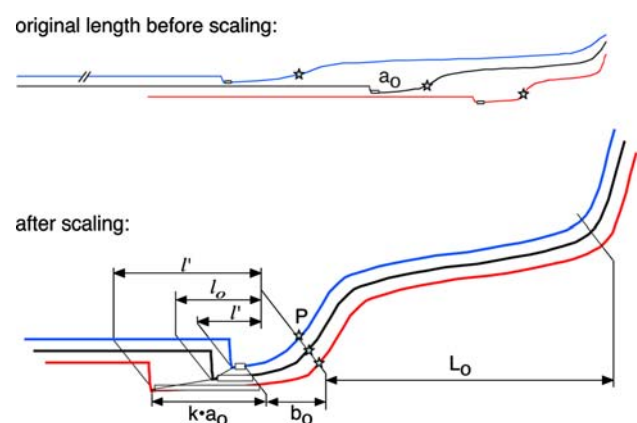


Fig. 5 Scaling model and calculation. Before scaling: Pili with different lengths but equal nucleation kernel a_0 . Standard pilus (black), short pilus (red), long pilus (blue), critical elongation point (star). After scaling: Pili have the same conservative length L_0 and b_0 but $k \cdot a_0$ changes according to the scaling: for short pili to a longer hysteresis l' (red) and for long pili vice versa (blue)

$$l_0 = a_0 + b_0.$$

Analogous the plateau length of any other pilus refers to:

$$l = a_0 + b.$$

By scaling from L to L_0 ($L_0 = k \cdot L$) b scales to b_0 ($b_0 = k \cdot b$). But a_0 does not scale. Therefore, the scaled plateau length l' refers to:

$$l' = k \cdot l = k \cdot a_0 + k \cdot b = k \cdot a_0 + b_0$$

by replacing b_0 with $l_0 = a_0 + b_0$;

$$b_0 = l_0 - a_0;$$

$$l' = k \cdot a_0 + l_0 - a_0 = l_0 + a_0 \cdot (k - 1).$$

In order to obtain a value for a_0 we plotted the scaled length of the restacking hysteresis versus the original length of this hysteresis and fitted the data with the equation $l' = l_0 + a_0 \cdot (k - 1)$. With a_0 as the only fit parameter we retrieve a value of 47 ± 17 nm for a_0 . The fit is shown in Fig. 6 where additionally the nucleation length $a_0 \cdot k$ is subtracted from the hysteresis length $l \cdot k$. This shows, that without the constant length a_0 each pilus would superimpose after scaling within the thermal driven variation of the hysteresis length. The length a_0 will be interpreted as a nucleation length, which is required for the occurrence of stacking and is related to geometrical factors of the unstacked pilus.

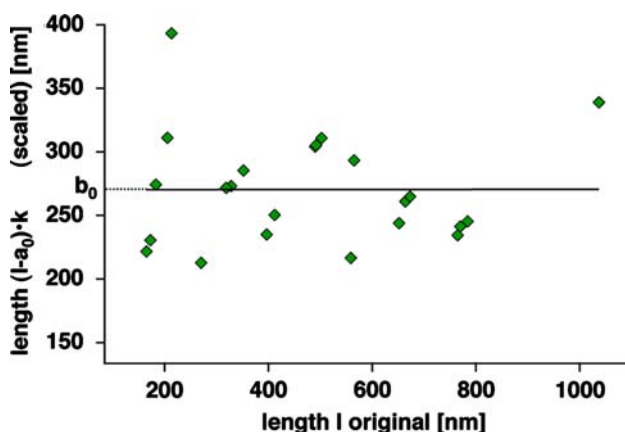


Fig. 6 Length of the hysteresis $l \cdot k$ after scaling minus the nucleation length $a_0 \cdot k$ plotted versus the original (unscaled) hysteresis length. After subtracting a_0 from each pilus, the black line-fit to the scaled remaining hysteresis length b_0 shows that the pilus now scales over its complete length. That means that the nucleation length a_0 is independent of the pilus length, whereas $b_0 = l_0 - a_0$ is the part of the hysteresis, which depends on it. The variance of the hysteresis length distribution is due to the influence of the thermal energy

Discussion

Nucleation seed formation

Relaxation of the pilus below an extension of 61% of the contour length L_c allows the formation of a nucleation seed, which is sufficient for restacking. Apart from the tip fibrillum and the membrane anchor PapH, the pilus is homogeneously composed of identical PapA units. A singular domain of the pilus, like the tip fibrillum, is conceivable to induce the nucleation. But since the pilus is grabbed non-specifically on any Pap unit, it is improbable that these structures significantly contribute to the stacking. Furthermore, the hysteresis pattern is not a singular event while restacking: in some force curves additional hysteresis-like patterns can be observed during the restacking within the first plateau (see the arrows to the lower left in Fig. 3). We interpret this as additional nucleation seeds due to stuck restacking. For these reasons neither the single PapH nor the tip fibrillum with an estimated length of roughly 200 nm seems to originate the nucleation seeds for stacking nor to contribute for the scaling mismatch a_0 .

In our picture, the stacking only is possible after a certain number of PapA units had formed a spontaneous nucleation seed. When transforming the nucleation length a_0 into a number of PapA units at the actual pilus extension of 61% L_c we obtain 20 ± 7 PapA units or five turns ($47 \text{ nm} / (4.1 \text{ nm} \cdot 0.61)$). Calculating the hysteresis area, which corresponds to the length of 47 nm of the nucleation kernel, one can estimate a nucleation energy of about $4.8 \text{ k}_B\text{T}$ per kernel unit³ needed for restacking.

Dynamic restacking

Our results from the dynamic measurements are in good agreement with those from existing OT experiments. The fact that especially in OT experiments additional hysteresis-like patterns (drops) occur while restacking within the first plateau indicates, that the torque in the pilus also has an influence on the polymerisation of the stacked region. These additional spontaneous drops occur in almost every OT force curve when relaxing within the first plateau (Andersson et al. 2006c). They are rare in AFM experiments (below 10%) as indicated with the arrows in Fig. 3. A possible explanation for this could be the different boundary conditions in an AFM and an OT experiment. In an OT experiment, the trapped spherical bead in the laser-focus, to which a single pilus is bound, can freely rotate around the axis of the pilus. That is, the pilus is allowed to relax its torsion by rotating the bead in the laser-focus

³ (length of nucleation kernel \times force difference to the plateau) / (# PapA $\cdot 4.1 \text{ pNnm}$) = ($47 \text{ nm} \cdot 8.3 \text{ pN}$) / ($20 \cdot 4.1 \text{ pNnm}$) = $4.8 \text{ k}_B\text{T}$.

during the experiment. The torsion has to be regained if the pilus wants to restack into the helical rod formation upon relaxation. In contrast, the pilus is fixed between the cantilever tip and the anchorage of the *E. coli* membrane in an AFM experiment. This might preserve torsion and ease the restacking.

In both, the OT and the AFM measurements we have a certain decrease of the height in the constant force plateau while restacking with an increased velocity and the unstacking occurs at higher forces. After subtracting the additional force caused by cantilever hydrodynamics (8.68 ± 0.11 pN s/ μm) (Janovjak et al. 2005), still a force offset between expansion and retraction remains. This lowering of the restacking force plateau with increasing speed is the same as in the OT experiments (Fig. 3). It is due to the finite restacking kinetics required for the bond ruptures and formations respectively (Andersson et al. 2006b). As shown above, the initial formation of the restacking seed takes place at a velocity of only 18 nm/s. Nevertheless the restacking plateau is not lowered yet to zero even at velocities of 7 $\mu\text{m/s}$. The 2nd Plateau (region III) is passed through in thermal equilibrium fully reversible for all measured velocities. This indicates that the kinetics of the pilus transformations in this region is much faster than 7 $\mu\text{m/s}$. The forces suggest entropic stretching as well as pure elastic deformations in the molecular structure. For the restacking plateau (region II) the equilibrium condition (unstacking curve identically reproduces the restacking curve) only holds for velocities at 200 nm/s and below (data not shown). Of course, the hysteresis itself is not an equilibrium process. Nevertheless it should be mentioned, that the relaxing part (lower part) of the hysteresis is highly conserved at all measured velocities. This again indicates fast kinetics originated from entropic and elastic deformations of the PapA units.

The hysteresis in the relaxing force curve represents the unstacked PapA units in a metastable phase comparable to an undercooled liquid (Spinella et al. 1998). This state starts from the binodial point (reference point P). Upon further relaxing, the probability for cooperative fluctuations and therefore for nucleation seed formation increases. Nucleation seeds need to reach a critical size to start phase transition. For restacking, we determined a possible kernel size to be 20 ± 7 PapA units. We measured mechanical nucleation energy of 4.8 ± 1.7 $k_B T$ per seed unit. This nucleation earliest occurs at 61% elongation for all velocities. For high velocities, the latest seed formation is shifted to lower elongations until the spinodial point is reached at 59% (see Fig. 3). Then the phase transition takes place while the two phases of stacked and unstacked PapA units coexist in a stable equilibrium at 27 pN. Seed formation is an important but not trivial process and will be topic of further investigations.

Specific PapG-Galabiose bond

Additional Galabiose blocking experiments showed, that a specific PapG-Galabiose complex preferably opens at forces of 27 and 49 ± 3 pN. The probability for bond opening at 27 pN is naturally enlarged due to the long time of loading at the first plateau under the influence of the thermal noise. But 72% of the bonds withstand forces stronger than the first plateau. This maintains unstacking of the pilus and with it a prolongation of the bonds' lifetime. The second plateau shows a soft increase in force from 50 to 70 pN. This allows the Galabiose bond to rupture at reduced loading rates even if the separation velocity is high. The whole mechanism seems evolutionarily reasonable, because the pilus uses its stretching and restacking properties to stabilize the Galabiose bond but it opens before irreversible disintegration (compare tether formation in human cells (Sun et al. 2005)). The results are in good agreement to previously reported unbinding forces for type IV pili (Merz et al. 2000; Touhami et al. 2006). They are comparable to forces which affect the elongation and retraction of type IV pili and to unstacking forces of type I pili (Maier et al. 2004; Miller et al. 2006). The Monte Carlo simulation of the specific bond provides reasonable values for the natural dissociation rate $K_{\text{Off}} = 8.0 \cdot 10^{-4} \pm 5.0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ and the potential width $\Delta x = 0.7 \pm 0.15$ nm. The simulation used presents an effective method to analyze the measured data obtained by probing specific bonds with a single retract velocity. The data are comparable to other single receptor ligand systems (Florin et al. 1994; Neuert et al. 2006). Further studies can reveal, if the PapG-Galabiose bond is comparable to the allosteric catch-bond mechanism of FimH adhesins, which bind to mannosylated surfaces found by (Thomas et al. 2006). The unstacking-mechanism equally spreads the overall binding force to each pilus and therewith stabilizes the total binding process. The restacking process is slow and the hysteresis, delays restacking even more after an elongation into the regime to open the PapG-Galabiose bond. This might enhance the probability of fishing another Galabiose molecule while reeling in the pilus. This first examination of P-pili stretching and restacking with the AFM gives insights into the mechanisms that sum up the profit of the pili concept.

Acknowledgments This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, the Alexander von Humboldt Foundation and the Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD). Technical support from Asylum Research Inc. (Santa Barbara, CA., USA) and helpful discussions with Julia Morfill and Elias Puchner are gratefully acknowledged. Especially, we thank Angelika Kardinal for cell culturing, Susanne Kempter for TEM imaging, Prof. Bernt-Eric Uhlin, Dept. of Molecular Biology, Umeå University, Sweden, for providing the *E. coli* strains and Prof. Ulf J. Nilsson, Organic and Bioorganic Chemistry, Lund University, Sweden, for providing Galabiose and soluble Galabiose.

References

- Andersson M, Fallman E, Uhlin BE, Axner O (2006a) A sticky chain model of the elongation and unfolding of *Escherichia coli* P pili under stress. *Biophys J* 90:1521–1534
- Andersson M, Fallman E, Uhlin BE, Axner O (2006b) Dynamic force spectroscopy of *E coli* P pili. *Biophys J* 91:2717–2725
- Andersson M, Fallman E, Uhlin BE, Axner O (2006c) Force measuring optical tweezers system for long time measurements of P pili stability. In: *Proceedings of SPIE* 6088
- Benoit M, Holstein T, Gaub HE (1997) Lateral forces in AFM imaging and immobilization of cells and organelles. *Eur Biophys J Biophys Lett* 26:283–290
- Binnig G, Quate CF, Gerber C (1986) Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 56:930–933
- Bippes CA, Humphris ADL, Stark M, Muller D, Janovjak H (2006) Direct measurement of single-molecule visco-elasticity in atomic force microscope force-extension experiments. *Eur Biophys J Biophys Lett* 35:287–292
- Bullitt E, Makowski L (1995) Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. *Nature* 373:164–167
- Bullitt E, Makowski L (1998) Bacterial adhesion pili are heterologous assemblies of similar subunits. *Biophys J* 74:623–632
- Bullitt E, Jones CH, Striker R, Soto G, JacobDubuisson F, Pinkner J, Wick MJ, Makowski L, Hultgren SJ (1996) Development of pilus organelle subassemblies in vitro depends on chaperone uncapping of a beta zipper. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol 93, pp 12890–12895
- Evans E, Ritchie K (1997) Dynamic strength of molecular adhesion bonds. *Biophys J* 72:1541–1555
- Evans E, Ritchie K (1999) Strength of a weak bond connecting flexible polymer chains. *Biophys J* 76:2439–2447
- Florin EL, Moy VT, Gaub HE (1994) Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science* 264:415–417
- Friedsam C, Wehle AK, Kuhner F, Gaub HE (2003) Dynamic single-molecule force spectroscopy: bond rupture analysis with variable spacer length. *J Phys Condens Matter* 15:S1709–S1723
- Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE (2006) Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 312:1355–1359
- Grandbois M, Beyer M, Rief M, Clausen-Schaumann H, Gaub HE (1999) How strong is a covalent bond? *Science* 283:1727–1730
- Grandbois M, Dettmann W, Benoit M, Gaub HE (2000) Affinity imaging of red blood cells using an atomic force microscope. *J Histochem Cytochem* 48:719–724
- Jager IL (2001) The “sticky chain”: a kinetic model for the deformation of biological macromolecules. *Biophys J* 81:1897–1906
- Janovjak HJ, Struckmeier J, Muller DJ (2005) Hydrodynamic effects in fast AFM single-molecule force measurements. *Eur Biophys J Biophys Lett* 34:91–96
- Jass J, Schedin S, Fallman E, Ohlsson J, Nilsson UJ, Uhlin BE, Axner O (2004) Physical properties of *Escherichia coli* P pili measured by optical tweezers. *Biophys J* 87:4271–4283
- Jiang Z, Mu X, Bullitt E (2002) Site-specific mutations in PapA cause morphologic changes in the structure of P-pili. *Mol Biol Cell* 13:515A–515A
- Larsson A, Ohlsson J, Dodson KW, Hultgren SJ, Nilsson U, Kihlberg J (2003) Quantitative studies of the binding of the class II PapG adhesin from uropathogenic *Escherichia coli* to oligosaccharides. *Bioorg Med Chem* 11:2255–2261
- Li HB, Oberhauser AF, Fowler SB, Clarke J, Fernandez JM (2000) Atomic force microscopy reveals the mechanical design of a modular protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol 97, pp 6527–6531
- Lindberg FP, Lund B, Normark S (1984) Genes of pyelonephritogenic *Escherichia-Coli* required for digalactoside-specific agglutination of human-cells. *Embo J* 3:1167–1173
- Lugmaier RA, Hugel T, Benoit M, Gaub HE (2005) Phase contrast and DIC illumination for AFM-Hybrids. *Ultramicroscopy* 104:255–260
- Lund B, Lindberg F, Marklund BI, Normark S (1987) The Papg protein Is the Alpha-D-Galactopyranosyl-(1-4)-Beta-D-Galactopyranose-binding adhesin of Uropathogenic *Escherichia-Coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol 84, pp 5898–5902
- Maier B, Koomey M, Sheetz MP (2004) A force-dependent switch reverses type IV pilus retraction. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol 101, pp 10961–10966
- Merz AJ, So M, Sheetz MP (2000) Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* 407:98–102
- Miller E, Garcia T, Hultgren S, Oberhauser AF (2006) The mechanical properties of *E-coli* type 1 pili measured by atomic force microscopy techniques. *Biophys J* 91:3848–3856
- Mu XQ, Bullitt E (2006) Structure and assembly of P-pili: a protruding hinge region used for assembly of a bacterial adhesion filament. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol 103, pp 9861–9866
- Mu XQ, Jiang ZHG, Bullitt E (2005) Localization of a critical interface for helical rod formation of bacterial adhesion P-pili. *J Mol Biol* 346:13–20
- Neuert G, Albrecht C, Pamir E, Gaub HE (2006) Dynamic force spectroscopy of the digoxigenin-antibody complex. *Febs Lett* 580:505–509
- Ohlsson J, Jass J, Uhlin BE, Kihlberg J, Nilsson UJ (2002) Discovery of potent inhibitors of PapG adhesins from uropathogenic *Escherichia coli* through synthesis and evaluation of galabiose derivatives. *Chembiochem* 3:772–779
- Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez JM, Gaub HE (1997a) Reversible unfolding of individual titin Ig-domains by AFM. *Science* 276:1109–1112
- Rief M, Oesterhelt F, Heymann B, Gaub HE (1997b) Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by AFM. *Science* 275:1295–1298
- Russo TA, Johnson JR (2003) Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect* 5:449–456
- Sauer FG, Futterer K, Pinkner JS, Dodson KW, Hultgren SJ, Waksman G (1999) Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science* 285:1058–1061
- Sauer FG, Pinkner JS, Waksman G, Hultgren SJ (2002) Chaperone priming of pilus subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation. *Cell* 111:543–551
- Sharma D, Cao Y, Li HB (2006) Engineering proteins with novel mechanical properties by recombination of protein fragments. *Angewandte Chemie-International Edition* 45:5633–5638
- Spinella C, Lombardo S, Priolo F (1998) Crystal grain nucleation in amorphous silicon. *J Appl Phys* 84:5383–5414
- Sun MZ, Graham JS, Hegedus B, Marga F, Zhang Y, Forgacs G, Grandbois M (2005) Multiple membrane tethers probed by atomic force microscopy. *Biophys J* 89:4320–4329
- Thomas WE, Trintchina E, Forero M, Vogel V, Sokurenko EV (2002) Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell* 109:913–923
- Thomas W, Forero M, Yakovenko O, Nilsson L, Vicini P, Sokurenko E, Vogel V (2006) Catch-bond model derived from allostery

- explains force-activated bacterial adhesion. *Biophys J* 90:753–764
- Touhami A, Jericho MH, Boyd JM, Beveridge TJ (2006) Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* Pili by using atomic force microscopy. *J Bacteriol* 188:370–377
- Vetsch M, Puorger C, Spirig T, Gauschopf U, Weber-Ban EU, Glockshuber R (2004) Pilus chaperones represent a new type of protein-folding catalyst. *Nature* 431:329–332
- Zhang XH, Wojcikiewicz EP, Moy VT (2006) Dynamic adhesion of T lymphocytes to endothelial cells revealed by atomic force microscopy. *Exp Biol Med* 231:1306–1312

Molecular Force Balance Measurements Reveal that Double-Stranded DNA Unbinds Under Force in Rate-Dependent Pathways

Christian H. Albrecht,* Gregor Neuert,[†] Robert A. Lugmaier,* and Hermann E. Gaub*

*Applied Physics and Center for NanoScience, Ludwig-Maximilians-Universität München, 80799 Munich, Germany; and [†]Massachusetts Institute of Technology, Department of Physics, Cambridge, Massachusetts 02139

ABSTRACT Strand separation of double-stranded DNA is a crucial step for essential cellular processes such as recombination and transcription. By means of a molecular force balance, we have analyzed the impact of different pulling directions and different force-loading rates on the unbinding process of short double-stranded DNA. At loading rates above 9×10^5 pN/s, we found a marked difference in rupture probability for pulling the duplex in 3'-3' direction compared to a 5'-5' direction, indicating different unbinding pathways. We propose a mechanism by which unbinding at low loading rates is dominated by nondirectional thermal fluctuations, whereas mechanical properties of the DNA become more important at high loading rates and reveal the asymmetry of the phosphoribose backbone. Our model explains the difference of 3'-3' and 5'-5' unbinding as a kinetic process, where the loading rate exceeds the relaxation time of DNA melting bubbles.

INTRODUCTION

Conversion of double-stranded DNA (dsDNA) into single strands is crucial for essential cellular processes such as recombination, replication, and transcription. Molecular machines have evolved different mechanisms, depending on their physical functions, to separate the two strands. In RecA-assisted recombination, for example, the helix is enclosed in a narrow tunnel where it is stretched, unwound, and subsequently denatured (1). In contrast, RNA polymerase forms a transcription bubble that moves along the DNA template while RNA is polymerized. As for any other molecular machine, two basic mechanisms have been discussed in terms of the opening of DNA during transcription: 1), the power stroke, where the hydrolysis of the triphosphates is efficiently converted into mechanical work; and 2), the Brownian ratchet, where the process mainly is powered by thermal noise while chemical energy predominantly is used to rectify those fluctuations (2). Interestingly DNA separation by means of force probe instruments has been discussed in a quite similar way. Again, one discrete “mechanical” and one fuzzy “Brownian” model have been put forward to describe the unbinding reaction yet without definitive answers. In our study, we probed short dsDNA at different ends and at different speed by means of a molecular force balance. This method revealed previously unknown mechanical properties of the DNA helix that provide new insights into the unbinding mechanism of DNA.

A molecular force balance measures differences in the unbinding probability under force by direct comparison of a sample bond (Fig. 1, *red*) to a reference bond (Fig. 1, *blue*). A large number of such balances are attached at their opposing ends between a glass slide and a silicone stamp and probed in

parallel. On separation of stamp and slide, the polymeric spacers are gradually stretched, and the force builds up in the balances until either the reference bond or the sample bond fails, depending on which one has the higher bond strength (Fig. 1). As a consequence, the fluorescent label attached to the middle part of the balances will be found either on the stamp or on the glass surface. The difference in bond strength of the molecular complexes, therefore, can be quantified by measuring the fluorescence on both sides and provides the survival probability Φ_S of the sample bond (3,4). Due to the high sensitivity of this differential measurement principle, we could detect minute differences in binding force, as demonstrated for the discrimination between different kinds of single mismatches in 30 bp DNA (4,5). In addition, we established the concept of “dynamic” differential force measurements, where the duplexes are loaded with different rates. Compared to “static” measurements at constant velocity, dynamic studies are suited to map the energy landscape at many points, thereby revealing kinetic unbinding barriers (6–9).

Single-molecule force spectroscopy studies have demonstrated that only moderate forces in the piconewton range are required to disrupt receptor-ligand complexes, such as biotin-streptavidin, or to separate the strands in dsDNA, as long as only moderate loading rates are applied to the bond. This is because thermal fluctuations contribute to the unbinding reaction (10). Accordingly, a linear correlation between the logarithm of the loading rate and the rupture force has been measured for the unbinding of different short DNA duplexes (7). By means of a molecular force balance, we demonstrate that short dsDNA shows a nonlinear force response when a critical loading rate of $\sim 9 \times 10^5$ pN/s and a rupture force of ~ 68 pN are exceeded, indicating a change in the unbinding pathway. This effect is caused by an asymmetry between 5'-5' and 3'-3' pulling direction that becomes significant when DNA is probed at a kinetic regime where mechanics dominates

Submitted November 8, 2007, and accepted for publication January 24, 2008.

Address reprint requests to Hermann E. Gaub, E-mail: gaub@lmu.de.

Editor: Jonathan B. Chaires.

© 2008 by the Biophysical Society
0006-3495/08/06/4766/09 \$2.00

doi: 10.1529/biophysj.107.125427

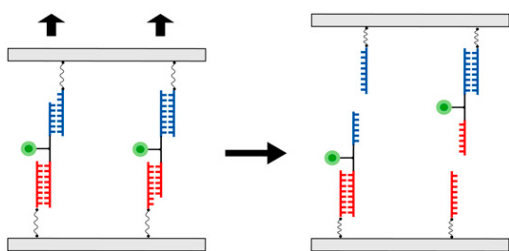


FIGURE 1 Differential force measurement with a molecular balance. Two force balances consisting of a reference duplex (*blue*) linked to a sample duplex (*red*) are immobilized and probed between two surfaces. Whereas the reference duplex is recessed in the left balance, the sample duplex is the shorter one in the right balance. The fluorescent label attached to the middle part of the balances either ends up on the upper surface, when the bond strength of the reference duplex is higher than that of the sample duplex, or on the bottom, when the bond strength of the reference duplex is lower than that of the sample duplex.

thermal fluctuations. We discuss this behavior by reconciling two opposing models put forward to explain the transition state of DNA unbinding (“force-induced melting” as a hypothesis for the B- to the S-form transition) (11–13) and overstretching (“S-form” stretched conformations with intact base pairing) (14,15).

MATERIAL AND METHODS

The differential force assay

In contrast to force probe techniques, in which individual molecules are loaded by means of a microscopic transducer, the differential measurement was performed simultaneously on a macroscopic number of balances ($\sim 10^9$) by probing the molecular bridges that had formed over a large area of $\sim 1 \text{ mm}^2$ between a silicone stamp and a glass slide. To assemble the balances, amino-modified oligonucleotides were immobilized on an aldehyde-activated glass slide. Oligonucleotides labeled with Cy3 fluorophore then were hybridized to the amino oligonucleotides, thus forming a sample duplex. Subsequently, oligonucleotides labeled with biotin at the 5'-terminus were hybridized to the Cy3-oligonucleotide thereby forming a reference duplex. (Oligonucleotides used in this study were purchased from IBA, Goettingen,

Germany.) The structure of the balance used for this study is depicted in Table 1, which shows one force balance in standard orientation (top), one in upside-down orientation (middle), and one with restored symmetry, where both duplexes were probed in 5'-5' direction (bottom).

Coupling of the balances to the silicone stamp was facilitated by streptavidin-biotin interaction as depicted in Fig. 2 c. The silicone stamp comprised 16 protruding pads, each with a diameter of 1.1 mm. Each pad was brought into contact with a spot of force balances on the slide (Fig. 2 a). The top of each pad was structured by a micropattern of rectangular contact areas that were elevated by $5 \mu\text{m}$ (Fig. 2 b). When the stamp was moved closer to the slide, each of the rectangular areas made contact with it and coupled to multiple balances (represented by a single balance in Fig. 2 c). The trenches served as drainage channels. After coupling, the stamp was separated from the slide by means of a piezo actuator, thereby probing and rupturing the balances. This resulted in a distribution of the Cy3 labels between stamp and slide, which was read by a laser scanner (Fig. 2 d). Coupling of the balances to streptavidin and disruption of the balances were performed at 25°C in $1\times$ SSC buffer (150 mM NaCl; pH 7.2). For further details about these methods, see Albrecht and colleagues (4).

To correct for those balances that had not coupled to the stamp, soluble streptavidin-AlexaFluor647 conjugate was bound to the free biotin residues on the slide, and the signal again was read by the scanner. The output of a differential force experiment, the survival probability of the sample duplex Φ_s , was calculated from four input parameters that were extracted from the two fluorescence scans, as depicted in Fig. 3. The remaining Cy3 intensity (Cy3_{REM}) was extracted from the rectangular prints in the green scan, where contact had been established between stamp and slide. Cy3_{REM} corresponded to balances that had been probed and ruptured at the reference duplex as well as to balances that had not been coupled to the stamp, thereby causing an offset. The start Cy3 intensity ($\text{Cy3}_{\text{START}}$) that corresponded to the initial density of balances immobilized on the slide was extracted from the grid pattern in the green scan. If the coupling efficiency of the balances was 100%, then the survival probability of the sample bond would be $\Phi_s = \text{Cy3}_{\text{REM}} / \text{Cy3}_{\text{START}}$. However, both Cy3 variables first had to be corrected for the offset of balances that had not been coupled. The red scan, therefore, was analyzed in terms of the remaining biotin density ($\text{AF647}_{\text{REM}}$) and the start biotin density ($\text{AF647}_{\text{START}}$) (Fig. 3). The degree of coupling then corresponded to $\text{AF647}_{\text{REM}} / \text{AF647}_{\text{START}}$, and the offset was calculated as follows:

$$\text{Cy3}_{\text{offset}} = \text{Cy3}_{\text{START}} \cdot \frac{\text{AF647}_{\text{REM}}}{\text{AF647}_{\text{START}}}$$

The survival probability of the sample duplex Φ_s was determined from the offset corrected Cy3_{REM} normalized to the offset corrected $\text{Cy3}_{\text{START}}$ as follows:

TABLE 1 Molecular balances in standard orientation (top) upside-down orientation (middle), and with restored symmetry where both duplexes are probed in 5'-5' direction (bottom)

Oligo dir.	Pulling dir.	Oligo No.	Sequence
3'-5'	3'-3'	134	<-NH ₂ -10t-CTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGAT
5'-3'		118	GACGTCCTTAAGCTATAGTTTGAATAGCTAc-8t-Cy3-8t-cATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAG
3'-5'	5'-5'	62	TAGCTATTCGAACTATAGCTTAAGGACGTC-10t-Bio->
5'-3'	5'-5'	124	<-NH ₂ -10t-CTGCAGGAATTCGATATCAAGCTTATCGAT
3'-5'		118	GACGTCCTTAAGCTATAGTTTGAATAGCTAc-8t-Cy3-8t-cATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAG
5'-3'	3'-3'	125	TAGCTATTCGAACTATAGCTTAAGGACGTC-10t-Bio->
5'-3'	5'-5'	113	<-NH ₂ -10t-TAGCTATTCGAACTATAGCTTAAGGACGTC
3'-3'		117	ATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGc-6t-Cy3t-sfb-sanh-8t-cATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAG
3'-5'	5'-5'	123	TAGCTATTCGAACTATAGCTTAAGGACGTC-10t-Bio->

The sequences of the middle oligonucleotide of the rectified balance (bottom) were synthesized separately and then conjugated by SFB-aldehyde and SANH-hydrazine reagents (Merck, Darmstadt, Germany). Left = slide; right = stamp. Sample duplex (*bold*) and reference duplex (*normal*). Labels: NH₂ = amino; Cy3 = Cyanin-3 fluor; Bio = biotin; 8t = poly-t-spacer. The force is applied along the arrows. The sequences of the middle oligonucleotide of the balance were synthesized separately and then conjugated by SFB-aldehyde and SANH-hydrazine reagents (Merck).

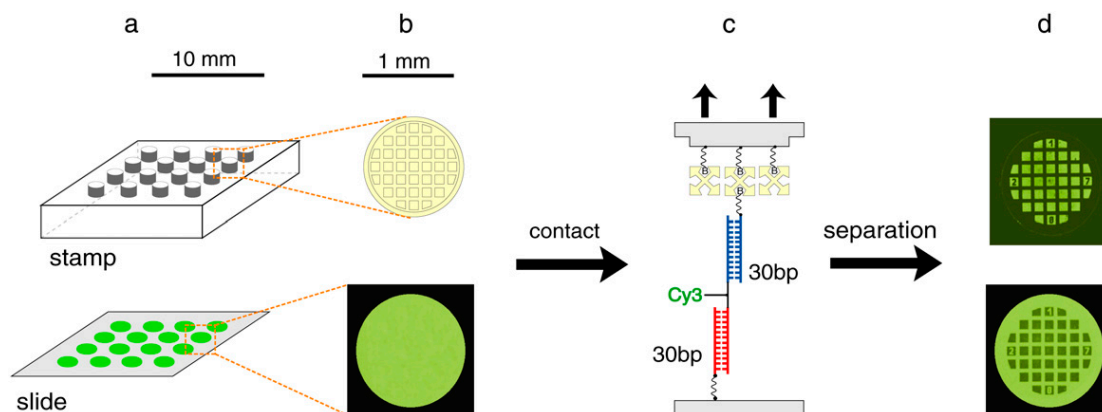


FIGURE 2 Contact and separation of stamp and slide. (a) Scheme of a silicone stamp having 16 contact pads and a glass slide having 16 spots of force balances. (b) A single pad with a microstructure of elevated rectangular contact areas covered with streptavidin (yellow) and a fluorescence image of a single spot (green). (c) Coupling of a single biotinylated force balance (representing a multitude of balances at one contact area) to streptavidin on the stamp. (d) Fluorescence image of stamp and spot after separation: The dark rectangular prints in the spot indicate where contact has been established and balances have coupled to the stamp.

$$\Phi_S = \frac{Cy3_{REM} - Cy3_{offset}}{Cy3_{START} - Cy3_{offset}}.$$

Correction for coupling efficiency and normalization to $Cy3_{START}$ were performed for all experimental data. For the images in Figs. 5 and 8, an average $Cy3_{offset}$ was determined from all contact areas. For the plots in Fig. 6, the correction was calculated separately for the referring contact area.

Dynamic differential force assay

Due to the accumulative binding force of $\sim 10^9$ molecular balances at one contact area, a very strong interaction is created between stamp and slide. The stamp, therefore, is not separated immediately over the whole contact area; it deforms elastically instead and detaches in a propagating cleft from the rigid

slide when pulled apart by the piezo actuator. This separation process commences at the edges of the rectangular contact areas and moves forward until complete separation (Fig. 4 a).

As long as the stamp is pulled apart by low velocities up to ~ 50 nm/s, the lateral speed of the cleft propagation is almost constant over all contact areas of the stamp. However at elevated piezo speeds, detachment does not keep pace with movement in the z -direction, and strain accumulates in the stamp. This tension leads to a nonlinear separation behavior; detachment occurs relatively slow at the edges of the contact areas but accelerates markedly toward the points where contact remains longest. As a consequence, a steep velocity gradient and a broad range of loading rates are accomplished over a single contact area. We used this effect for dynamic measurements and analyzed the velocity gradient by means of reflection interference contrast microscopy (RICM) in a manner comparable to the approach used by Leckband (16). For this purpose, we mounted the contact device on an inverted microscope (Axiomat; Zeiss, Goettingen, Germany) as depicted in Fig. 4 a. The contact interface of stamp and slide was illuminated by means of a xenon arc lamp, a neutral 50/50 beam splitter, and a 628/40-nm HC band-pass excitation filter (AHF Analysentechnik, Tuebingen, Germany) through a $10\times$ Fluar objective (NA 0.5) (Zeiss). Separation was filmed at 500 frames/s with a high-speed camera (PCO 1200HS; PCO, Kehlheim, Germany). A single RICM frame of the whole stamp pad is depicted in Fig. 4 a; individual contact areas are shown in Fig. 4 b.

The effective separation velocities were derived by converting the lateral movement of the first and second interference maximum into separation distances in the z -direction, according to the method described by Wiegand et al. (17) and Rädler and Sackmann (18). This was done under the assumption that the geometry of the separation cleft in a first approximation (Fig. 4 a) is wedge-shaped, which was corroborated by finite element simulations not shown here. In Fig. 4 b, four frames from a high speed RICM movie are shown; they were analyzed along a region of interest with a width of three pixels (white line) by plotting an averaged intensity profile over the position on the slide (shown here for frames one and two). The first (L_1) and second (L_2) maximum next to the contact area were fitted with a Gaussian curve to determine their lateral position. The lateral velocity v_L of the peeling process was determined from a diagram on which the first maxima were plotted as a function of position and time. From the lateral distances (L_1 and L_2) and the heights of the interference maxima ($h_1 = 124 \pm 3$ nm and $h_2 = 362 \pm 5$ nm at a 628-nm wavelength), a conversion factor k was derived. This transformed the lateral peeling speed into a z -directional separation velocity via $v_z = k \times v_L$ with $k = (h_2 - h_1)/(L_2 - L_1)$ (17). After a certain progress in separation, however, the first and second interference maximum around the

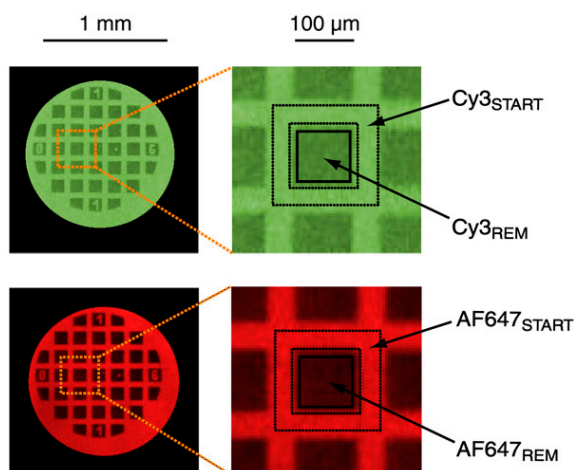


FIGURE 3 Two images of the same spot after separation. Dark squares correspond to the contact area where the balances have ruptured. Scans for Cy3 (green) and for streptavidin-AlexaFluor647 (red), which was bound to free biotins after scanning for Cy3. $Cy3_{START}$ intensity and $AF647_{START}$ intensity are derived from the area surrounded by the dashed lines. $Cy3_{REM}$ intensity and $AF647_{REM}$ intensity are derived from the area surrounded by the solid lines.

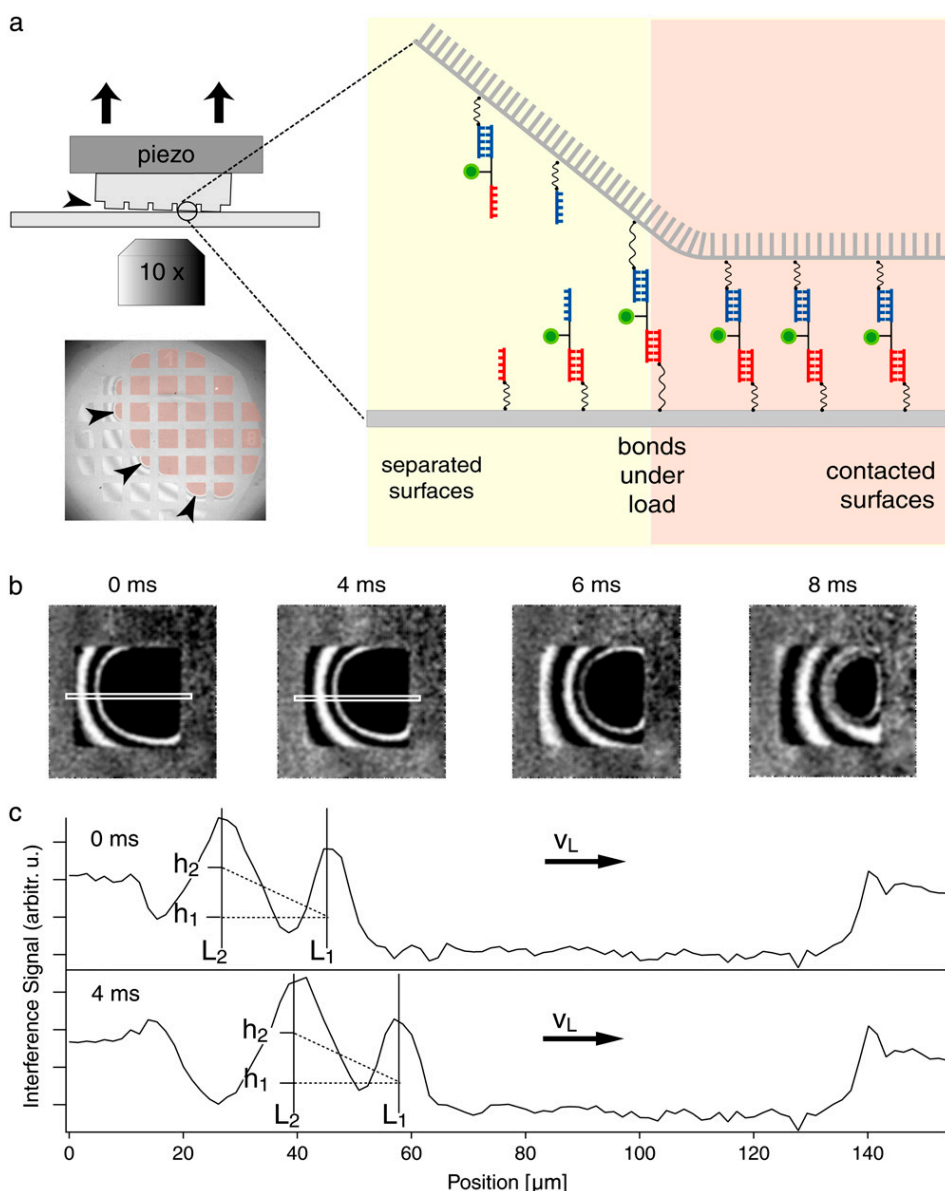


FIGURE 4 (a) Schematics and interference micrograph of slide-stamp separation driven by piezo movement. Slide-stamp contact areas (light red) are separated at the edge of the propagating cleft at which the balances are loaded and ruptured. The separation direction is indicated by black arrowheads. (b) RICM images show a single contact area at different times: 0 ms, 4 ms, 6 ms, and 8 ms. Each profile is measured along the white marking, which is perpendicular to the direction of movement of the bright interference rings (images on the left side). (c) RICM profile at the time $t_1 = 0$ ms (upper section) and at the time $t_2 = 4$ ms (lower section) showing the first and second interference maximum at the positions L_1 and L_2 . Between the frames 0 ms and 4 ms, the two maxima move with a lateral velocity $v_L = 3.1 \times 10^3 \mu\text{m/s}$ to the right. This corresponds to a stamp-slide separation velocity $v_Z = 40 \mu\text{m/s}$ (see text for calculation). The heights of the stamp over the slide are referred as h_1 and h_2 for the first and second maximum.

contacted area started to merge and became indistinguishable. This effect indicates that the slope of the stamp reaches the limit of the vertical resolution at this point, which can be estimated from the difference in height between the first and the second maximum (238 nm) divided by the limit of the lateral resolution (2380 nm), which corresponds to two camera pixels. The resolution limit of the slope, therefore, is an angle of 5.7° (tangent = 0.1). Because the velocity could not be determined after that point, it was extrapolated with a linear fit function (see Fig. 6, dotted line).

To transform the velocity profile obtained through RICM analysis into a loading rate profile, a simulation based on atomic force microscopy measurements was performed. A standard force curve for stretching a polymeric polyethylene glycol linker, which connects the balances to the stamp, was calculated with a freely jointed chain model. We assumed that the polyethylene glycol linker consisted of 68 monomers and accounted fully for the overall spring constant of the system. The spring constant of the silicone is very high and so negligible; we used a spring constant of 1000 pN/nm for the transducer. According to the method described by Friedsam et al. (19), we calculated the probability distributions of rupture force $P(F)$ and loading rate

$P(r)$ for every point in the separation velocity profile. Their maxima provide the most probable rupture force and the corresponding loading rate, which depends on the bond strength. We could do so because we had previously characterized the binding potential of a 30 bp DNA duplex by atomic force microscopy measurements. A potential width $\Delta x = 2.9$ nm and a natural dissociation rate $k_{\text{off}} = 4.4 \times 10^{-15} \text{ s}^{-1}$ was found and taken for these calculations. The values are in good agreement with data obtained by other groups (7). The most probable loading rate that corresponds to each point in the measured velocity profile is plotted with the survival probability over the distance in Fig. 6.

RESULTS AND DISCUSSION

In Fig. 5, three experiments are depicted in which the same kind of force balance was investigated at different velocities and molecular orientations. Sections of DNA spots on the slides are shown where fluorescence intensity was corrected

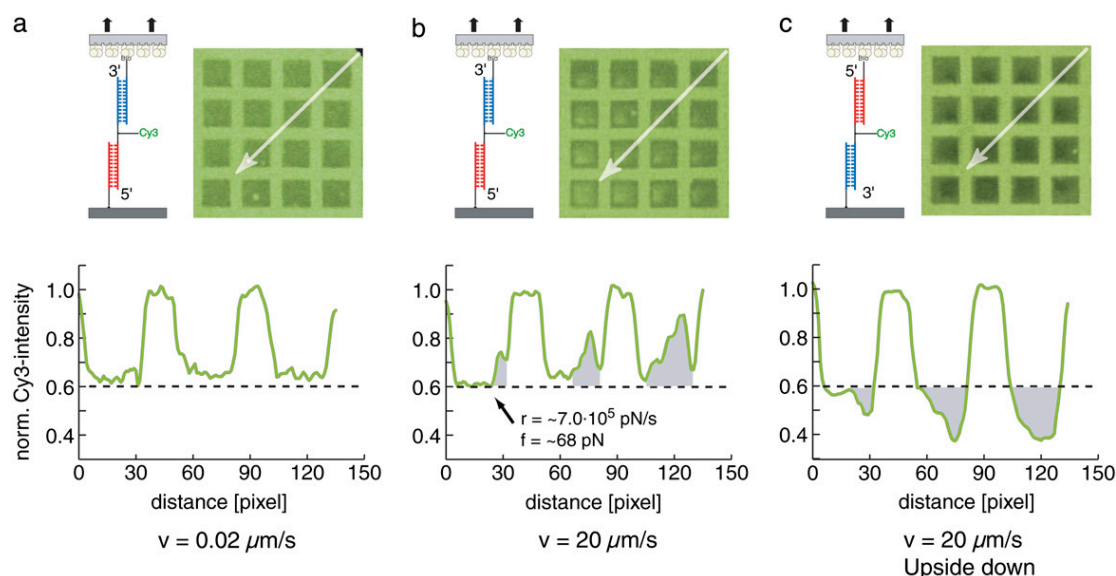


FIGURE 5 Normalized Cy3 intensity images where the contact areas correspond to Φ_S (survival probability of the sample duplex (red)). White selections in the images are plotted as normalized intensity over distance. Gray areas in the diagrams are specifying the nonlinear effect. (a) Molecular force balance probed at $0.02 \mu\text{m/s}$: The curve sections between the peaks (Φ_S) are relatively flat. (b) Molecular force balance probed at $20 \mu\text{m/s}$: Φ_S is increasing steeply in some contact areas. For the onset of the peaks, loading rate and rupture force were calculated (black arrow). (c) Molecular force balance turned upside-down and probed at $20 \mu\text{m/s}$. Φ_S is steeply decreasing in some contact areas. Images were smoothed by a median filter.

for coupling efficiency and normalized to the start values (intensity of the grid). The area of contact between slide and stamp corresponds to the darker squares, where Cy3-labeled oligonucleotides were probed and removed from the slide. The normalized intensity of the squares corresponds to the survival probability Φ_S of the sample duplex. In Fig. 5 *a*, the stamp was pulled apart by a very low velocity of $0.02 \mu\text{m/s}$. The profile (measured along the white arrow in the micrograph) shows normalized intensities between ~ 0.6 and 1. High values around 1 correlate with the grid structure in the micrograph, whereas the lower values originate from the rectangular contact areas and correspond to the survival probability of the sample duplex Φ_S . Apart from some noise, the Φ_S profile is relatively flat. For the experiment shown in Fig. 5 *b*, the stamp was removed a thousand times faster at $20 \mu\text{m/s}$. Under these conditions, the stamp distorts on retraction, which results in even higher peak values for the separation velocities in the centers of the square. Although the graph again shows Φ_S values of ~ 1 for the grid, the centers of the squares exhibit large irregularities throughout the contact area where Φ_S increases abruptly and culminates in peaks of ~ 0.9 .

To address the question of whether the correlation of high survival probabilities Φ_S and high velocity shown in Fig. 5 *b* is an intrinsic property of the molecular balance, it was probed in an upside-down orientation, also at $20 \mu\text{m/s}$. In fact, a similar effect but with an inverted sign, as shown in Fig. 5 *c*, was the consequence. As expected, Φ_S dropped to minima of ~ 0.35 instead of causing high values as in the previous experiment. This finding unambiguously corroborates the as-

sumption that the Φ_S maxima and minima in Fig. 5, *b* and *c*, reflect an increased stability of the sample duplex compared to the reference duplex at higher pulling velocities. It was thus desirable to determine the effective local pulling velocities, which apparently were different from the external velocity of piezo movement. As described above, contacting and separating stamp and slide was monitored by interference contrast microscopy. Inspection of the interference pattern supported the hypothesis of a dynamic separation process, starting with slow separation at the edges of the contact area and accelerating substantially toward the points where contact was maintained for the longest period of time. The velocity gradient was determined by RICM analysis along a section that crossed the nonlinear effect (Fig. 6, *white arrow*). Additionally, the loading rate profile and the force profile were calculated as described in the Materials and Methods section. Velocity and loading rate were plotted with the survival probability over the distance on the slide in Fig. 6 (see Fig. S1, Supplementary Material, Data S1, for force profile plotted with survival probability). Although a loading rate of $7 \times 10^5 \text{ pN/s}$ and a rupture force of $\sim 68 \text{ pN}$ was determined for the curve shown in Fig. 6 at the onset of the nonlinear effect, the average value was slightly higher. The average values as derived from six curves, each from a different contact area of the same spot, were as follows: $9.5 \times 10^5 \pm 1.6 \times 10^5 \text{ pN/s}$ of loading rate and $68.4 \pm 0.3 \text{ pN}$ of rupture force at 0.64 ± 0.01 of survival probability.

We concluded that the system obviously exhibits an asymmetry at high pulling velocities, despite both duplexes differing by only $\sim 3\%$ in Gibbs free energy when calculated with

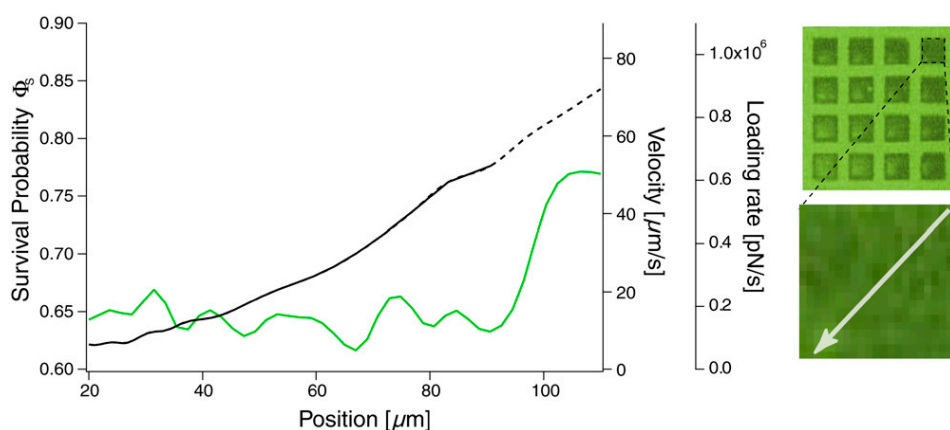


FIGURE 6 Upper right contact area of experiment in (Fig. 5 *b*). Survival probability of the sample duplex Φ_S was plotted over position on the slide (green line). Velocity and loading rate (black line) were determined as described above (dotted black line: extrapolated).

the nearest neighboring algorithm (20). This result was surprising because the balance should be insensitive to velocity changes due to its putative symmetry. To search for the break in the symmetry, we dissected the structure of the force balance as shown in Fig. 7. It became obvious that the assembly of the three oligonucleotides resulted in a lower duplex with 3'-3' pulling direction and an upper duplex with 5'-5' pulling direction. We concluded, therefore, that asymmetry in pulling geometry between the upper and lower duplex caused the

nonlinear effect. To test this hypothesis, we designed a new balance with restored symmetry, (except for the chirality) in which both duplexes were probed in the same backbone direction (Fig. 7 *a*) (see Table 1 for design). As expected, the balance with restored symmetry exhibited no kinetic peculiarities, as shown in Fig. 7 *b*. In fact, the Φ_S profile stayed flat for pulling velocities between 0.02 and 20 $\mu\text{m/s}$ and for loading rates as high as those depicted in Fig. 5 *b*.

We made another interesting discovery from various experiments in which balances were probed at 20 $\mu\text{m/s}$ or higher. Fig. 8 shows an experiment in which the standard

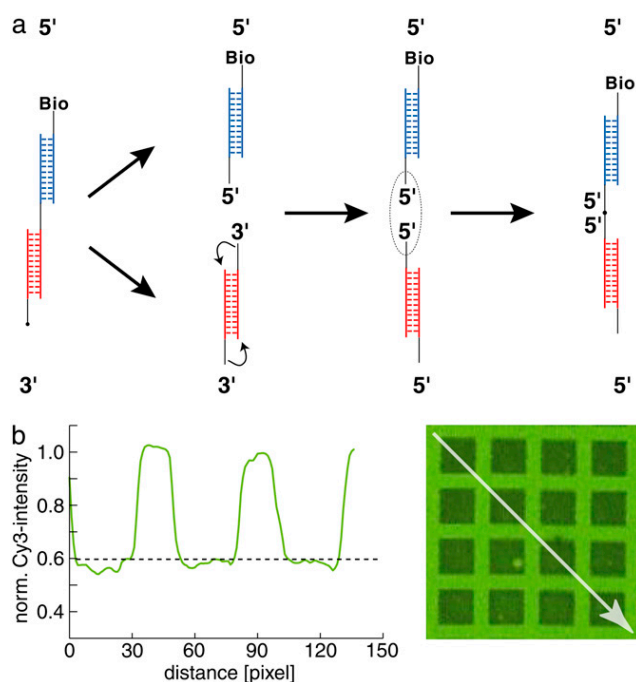


FIGURE 7 (*a*) Design of a fully symmetric balance. After dissecting the standard balance (*left*), it is evident that the sample duplex (*red*) is probed in 3'-3' direction and the reference duplex (*blue*) in 5'-5' direction. Conjugation of the duplexes at their 5'-termini results in a rectified balance, where both duplexes are probed in 5'-5' direction. The plot refers to the white arrow in the micrograph. (*b*) The loading rate dependence observed for the standard balance (Fig. 5 *b*) was canceled out by the design with restored symmetry. The curve was smoothed by a median filter.

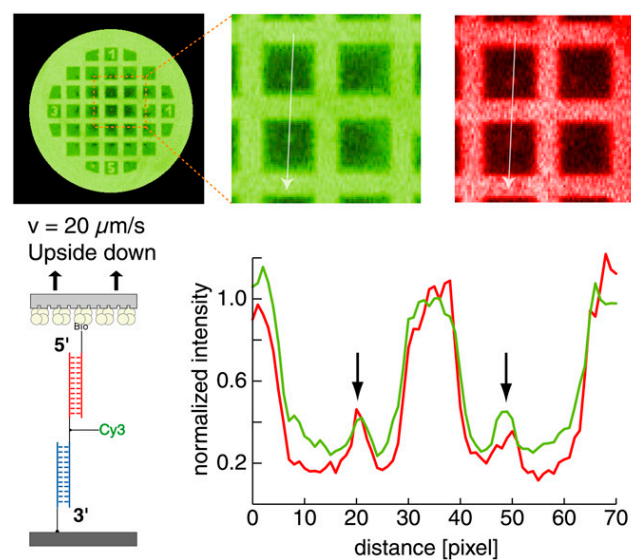


FIGURE 8 Experiment of an asymmetric standard balance in upside-down orientation pulled at 20 $\mu\text{m/s}$. Enlarged images of the contact area where the putative final contact points and show intensity peaks for Cy3 (*green*) and streptavidin-AlexaFluor647, which was bound to free biotins (*red*). The line plots, which are represented by the white arrows in the enlarged images, show a section through two contact areas and the putative last contact points where velocity and force-loading rate are assumed to be maximal (*black arrows* in the plot). Spikes in the Cy3 signal and AF647 signal indicate that bonds between biotin-oligonucleotide and streptavidin were ruptured at these points.

balance was immobilized in upside-down orientation comparable to that shown in Fig. 5 *c*. For the green images, the Cy3 signal was normalized to the start intensity. In Fig. 8, free biotins were labeled with soluble streptavidin-AlexaFluor647 conjugate after separation of stamp and slide, and the image again was normalized to the start intensity. In general, the Cy3 signal decreases to the center of the contact areas comparable to the spots depicted in Fig. 5 *c*. An additional effect, however, is evident in the middle of the central contact areas, where spikes of increased Cy3 intensity are visible in the enlarged images in the figure. Moreover, these spikes are also present in the AlexaFluor647 image at exactly the same location as evidenced by the line plots. At these locations, both DNA duplexes obviously are still intact, but biotinylated oligonucleotides were ruptured from the streptavidin on the stamp.

That different unbinding geometries of the same molecule could cause significant differences in rupture force most convincingly has been demonstrated by a comparison of DNA unzipping and shearing. Whereas the unzipping of a 16mer by pulling apart the 5' and 3' termini at one duplex end requires a force of only ~ 10 pN, for shearing in 5'-5' direction ~ 37 pN has been determined at a loading rate of 24 pN/s (21). Comparable results have been obtained by force balance experiments, when those different unbinding geometries have been measured directly (3,4). Although diverging forces for unzipping and shearing DNA are very intuitive, this is not the case for the two possible shear directions 5'-5' and 3'-3', which generally are assumed to exhibit similar unbinding characteristics. To date, no disparity has been measured, and even sophisticated considerations of DNA melting under force do not provide an explanation for it (12). The only hint comes from simulations where different transition states have been proposed for polymeric DNA, namely a narrow fiber for 5'-5' and an unwound ribbon for 3'-3' pulling direction (Fig. 9 *d*) (14,15,22).

Fig. 5 *b* shows that the balance becomes asymmetric once a critical loading rate is exceeded. The effect was found to appear at a loading rate of $\sim 9 \times 10^5$ pN/s and a rupture force of ~ 68 pN and is due to a kinetic unbinding barrier comparable to those which have been reported for the biotin-streptavidin and hapten-antibody complexes (9,23). Our study demonstrates that the asymmetry occurs because of the difference in geometry of the 5'-5' and 3'-3' pulling direction and disappears when a balance with restored symmetry consisting of two 5'-5' duplexes is used (Fig. 7). We assume that the so-called "S-form" transition states (14,15), which are structurally different for the two pulling directions (Fig. 9 *d*), are the origins of the asymmetry. Because this asymmetry only becomes apparent above a critical loading rate, however, another unbinding mechanism, which is insensitive to the pulling direction, must exist at lower loading rates. We assume that DNA bubbles are responsible for unbinding at low loading rates, according to the force-induced melting hypothesis (12). Because those thermal fluctuations are not

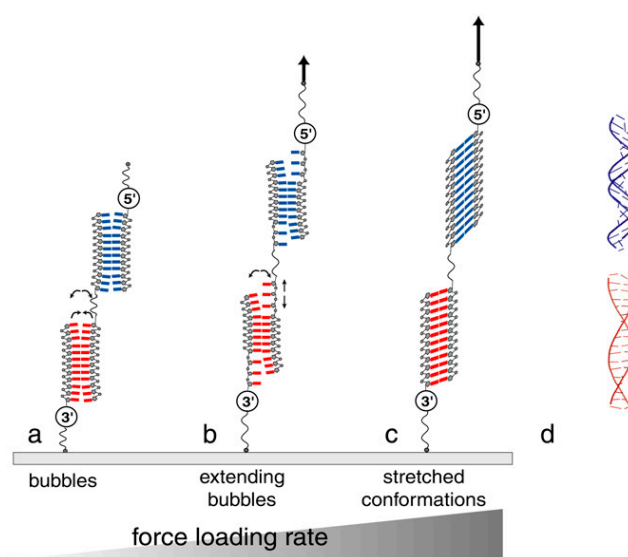


FIGURE 9 Model for the dominant transition state of DNA rupture dependent on pulling geometry and force-loading rate. (a) Unstretched B-DNA at zero force: Fluctuations are opening and closing the duplex at the ends (curved arrows). (b) At moderate loading rates, bubbles are growing because the applied strain hinders the closing reaction (small vertical arrows). (c) At loading rates higher than 9×10^5 pN/s, the duplexes are forced into stretched conformations with intact base pairing. (d) 5'-5' and 3'-3' pulling directions lead to different duplex structures (polyGC duplexes stretched 1.6 times (14,22)).

directed, they are suited to obscure most of the geometrical difference of unbinding in 5'-5' and 3'-3' direction. Hence, a distinction could be drawn between two regimes of unbinding: 1), a regime in quasiequilibrium at low loading rates where the reaction takes place assisted by thermal fluctuations, and 2), a kinetic regime at elevated loading rates where deformation is dominant over fluctuations and geometric properties of the helix are more meaningful. Altan-Bonnet and colleagues (24) have demonstrated that AT-rich sequences in a short duplex give rise to bubble-like fluctuations, which are characterized by a rate of $10^4 - 10^5$ /s. We interpret this breathing rate of DNA as an attempt frequency ν_{off} for overcoming the potential well of the duplex bond. In combination with the observed force-loading rate $r \sim 9 \times 10^5$ pN/s at the onset of the kinetic effect, one recognizes that the mechanical power $r \times \Delta x$ applied to the bond approaches the power achieved by thermal fluctuations: $r \times \Delta x \approx \nu_{\text{off}} \times k_B T$. This means that the duplex would have no more time to escape from the potential well by fluctuations, because the loading rate that is applied approaches the attempt frequency very closely. For situations in which the mechanical work eventually equals the entire depth of the well, $F \times \Delta x = \Delta G_{\text{off}}$, the potential model is no longer valid, because it requires the possibility of the duplex escaping from the well by fluctuations. At this point, a description based on continuum mechanics like that in the work by Lebrun and Lavery (14) would describe the experiment adequately. We therefore argue that the kinetic barrier observed in Fig. 5, *a* and *b*,

probably occurs when the mechanically forced separation of the strands is faster than the opening kinetics of the fluctuation bubbles, and so thermal contributions are becoming less important for unbinding. In other words, once force has accumulated in a DNA helix that was opened partially by thermal fluctuations, the closing reaction of the bubble will be stalled by the applied strain, and further extension of the bubble will proceed until the strands are separated. When the force-loading rate, however, is faster than the inherent opening rate, the remaining base pairs will be disrupted predominantly by mechanics. Accordingly, stretched conformations with intact base pairing (S-forms) (Fig. 9 *d*) become more important for the transition state than bubbles when a critical loading rate $r \sim 9 \times 10^5$ pN/s is exceeded. The fact that even biotin-streptavidin complexes are disrupted close to the position on the slide where the kinetic effect occurred corroborates the observation that much higher forces are accomplished in the loading rate regime after the kinetic effect (Fig. 8).

According to Lebrun and Lavery (14), 5'-5' pulling results in more stable conformations than 3'-3' pulling because of better base stacking in the narrow fiber structure. However, our study demonstrates that duplexes pulled at 3'-3' are more stable than their 5'-5' counterparts. This contradiction possibly could be solved by the use of a theoretical model that places more emphasis on electrostatic repulsion than the simple solvent counterion model used by Lebrun and Lavery (14), as they already have suggested. Then, interstrand electrostatic repulsion probably would destabilize 5'-5' stretched conformations more than 3'-3' stretched conformations, because the phosphate distances are much shorter in the narrow fiber model.

Our hypothesis is summarized in Fig. 9: *a*), At zero force, DNA is in B conformation except for the ends, where the duplex is constantly opened and closed (curved arrows) by thermal fluctuations. *b*), At moderate loading rates, the bubbles are rapidly extended by fluctuations because the closing reaction is hindered by the applied strain that keeps one strand at every duplex end in single-stranded conformation. *c*), At a critical loading rate, the strain is applied faster than the fluctuations, and significant deformation work occurs, which drives both duplexes into different stretched conformations.

Explaining kinetic unbinding barriers by explicit relaxation times or the frequency of fluctuations might be relevant for receptor-ligand interactions in general. Kinetic unbinding barriers have been reported first for biotin-avidin (9,23) and later for antigen-antibody complexes (8,23). A relation between temporal fluctuations characteristics and the external pulling rate might be suitable to explain those barriers as well. Much slower fluctuation kinetics than for DNA bubbles must be assumed, however, because the barriers for avidin are found at 10^2 and 10^4 pN/s.

Our results provide evidence that opening of short DNA duplexes is assisted by thermal fluctuations up to a loading

rate of $\sim 9 \times 10^5$ pN/s when force is applied in parallel to the helix. Above that limit, molecular machines would have to apply much higher forces in the separation of the double-stranded DNA due to higher energy dissipation. Of course, 9×10^5 pN/s is a very high value that hardly ever could be accomplished even by the strongest molecular machines. When proteins are bound to the helix, however, presumably lower loading rates are required to convert DNA into a stretched and completely closed conformation, comparable to those in RecA recombination. Moreover, it is likely that application of force in 5'-5' direction causes "inwinding", leading to a double-stranded DNA of smaller diameter, as suggested by Lebrun and Lavery (14) and Konrad and Bolonick (15). Although this mechanism will not result in opening of long DNA, the smaller diameter may be useful in situations where DNA must be pulled through a narrow pore.

CONCLUSIONS (SUMMARY)

Stretching of DNA under applied force is a well-investigated issue by scientists in regard to several subjects. Nevertheless, not all aspects are completely understood, and we have presented an essential new observation. The stretching of 30 bp DNA in a molecular balance revealed that, beyond a certain loading rate, the orientation of the strands becomes crucial. We have explained this behavior through the existence of two distinct kinetic regimes through which different unbinding pathways are passed. Due to the changes in conformation, our results demonstrate that the 3'-3' loaded strand is more stable than the 5'-5' loaded strand at high loading rates. The question of whether different pulling directions and loading rates will cause different effects when proteins are bound to the helix is one of the next subjects to be addressed by molecular balance experiments.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

To view all of the supplemental files associated with this article, visit www.biophysj.org.

We thank Dieter Braun for hardware support; Hauke Clausen-Schaumann for helpful discussions; and Ferdinand Kuehner and Steffen Mihatsch for providing the software to analyze the measured velocity values. We thank Richard Lavery for the Protein Data Bank files of stretched DNA and Dominik Ho for simulations and reviewing the manuscript. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft.

REFERENCES

1. Prevost, C., and M. Takahashi. 2003. Geometry of the DNA strands within the RecA nucleofilament: role in homologous recombination. *Q. Rev. Biophys.* 36:429–453.
2. Gelles, J., and R. Landick. 1999. RNA polymerase as a molecular motor. *Cell.* 93:13–16.
3. Albrecht, C., K. Blank, M. Lalic-Multhaler, S. Hirler, T. Mai, I. Gilbert, S. Schiffmann, T. Bayer, H. Clausen-Schaumann, and H. E.

- Gaub. 2003. DNA: a programmable force sensor. *Science*. 301: 367–370.
4. Albrecht, C., H. Clausen-Schaumann, and H. Gaub. 2006. Differential analysis of biomolecular rupture forces. *J. Phys. Condens. Matter*. 18:1–19.
 5. Neuert, G., C. H. Albrecht, and H. E. Gaub. 2007. Predicting the rupture probabilities of molecular bonds in series. *Biophys. J.* 93:1215–1223.
 6. Schwesinger, F., R. Ros, T. Strunz, D. Anselmetti, H. J. Guntherodt, A. Honegger, L. Jermutus, L. Tiefenauer, and A. Pluckthun. 2000. Unbinding forces of single antibody-antigen complexes correlate with their thermal dissociation rates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:9972–9977.
 7. Strunz, T., K. Oroszlan, R. Schafer, and H. J. Guntherodt. 1999. Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:11277–11282.
 8. Berquand, A., N. Xia, D. G. Castner, B. H. Clare, N. L. Abbott, V. Dupres, Y. Adriaensen, and Y. F. Dufrene. 2005. Antigen binding forces of single antilysozyme Fv fragments explored by atomic force microscopy. *Langmuir*. 21:5517–5523.
 9. Merkel, R., P. Nassoy, A. Leung, K. Ritchie, and E. Evans. 1999. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*. 397:50–53.
 10. Florin, E. L., V. T. Moy, and H. E. Gaub. 1994. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*. 264:415–417.
 11. Smith, S. B., Y. Cui, and C. Bustamante. 1996. Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules. *Science*. 271:795–799.
 12. Rouzina, I., and V. A. Bloomfield. 2001. Force-induced melting of the DNA double helix 1. Thermodynamic analysis. *Biophys. J.* 80:882–893.
 13. Harris, S. A., Z. A. Sands, and C. A. Laughton. 2005. Molecular dynamics simulations of duplex stretching reveal the importance of entropy in determining the biomechanical properties of DNA. *Biophys. J.* 88:1684–1691.
 14. Lebrun, A., and R. Lavery. 1996. Modelling extreme stretching of DNA. *Nucleic Acids Res.* 24:2260–2267.
 15. Konrad, M. W., and J. I. Bolonick. 1996. Molecular dynamics simulation of DNA stretching is consistent with the tension observed for extension and strand separation and predicts a novel ladder structure. *J. Am. Chem. Soc.* 118:10989–10994.
 16. Leckband, D., and J. Israelachvili. 2001. Intermolecular forces in biology. *Q. Rev. Biophys.* 34:105–267.
 17. Wiegand, G., K. Neumaier, and E. Sackmann. 1998. Microinterferometry: three-dimensional reconstruction of surface microtopography for thin-film and wetting studies by reflection interference contrast microscopy (RICM). *Appl. Opt.* 37:6892–6905.
 18. Rädler, J., and E. Sackmann. 1993. Imaging optical thickness and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces. *J. Phys. II France*. 3:727–748.
 19. Friedsam, C., A. K. Wehle, F. Kühner, and H. E. Gaub. 2003. Dynamic single-molecule force spectroscopy: bond rupture analysis with variable spacer length. *J. Phys. Condens. Matter*. 15:S1709–S1723.
 20. SantaLucia, J., Jr. 1998. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:1460–1465.
 21. Lang, M. J., P. M. Fordyce, A. M. Engh, K. C. Neuman, and S. M. Block. 2004. Simultaneous, coincident optical trapping and single-molecule fluorescence. *Nat. Methods*. 1:133–139.
 22. Lavery, R., and A. Lebrun. 1999. Modelling DNA stretching for physics and biology. *Genetica*. 106:75–84.
 23. Neuert, G., C. Albrecht, E. Pamir, and H. E. Gaub. 2006. Dynamic force spectroscopy of the digoxigenin-antibody complex. *FEBS Lett.* 580:505–509.
 24. Altan-Bonnet, G., A. Libchaber, and O. Krichinsky. 2003. Bubble dynamics in double-stranded DNA. *Phys. Rev. Lett.* 90:138101.

SUPPLEMENTARY MATERIALS:

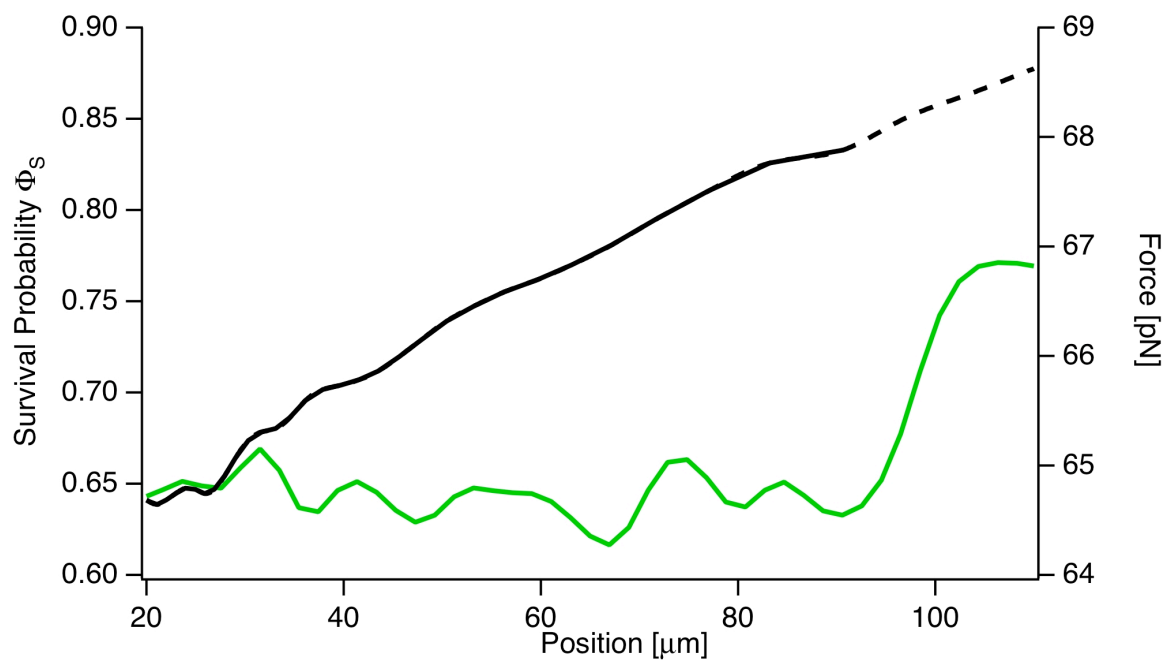


Fig. S1: Upper right contact area of experiment in 5b. Survival probability of the sample duplex Φ_s was plotted over position on the slide (green line). Most probable rupture force (black line) was determined as described in the “Material and Methods” section (dotted black line: extrapolated).

Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- **Hermann E. Gaub** für die Betreuung dieser Arbeit.
- **Martin Benoit** für sein unermüdliches Engagement bei der Zusammenarbeit am Experiment und der Auswertung der Messergebnisse sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- **Christian Albrecht** für die Zusammenarbeit bei DNA-Messungen, die Hilfe bei biologischen Fragestellungen, der Oberflächenfunktionalisierung und die Diskussion der Daten.
- **Ferdinand Kühner** für die tatkräftige Unterstützung bei allen Fragen und Problemen rund um das AFM.
- **Gregor Neuert** für die Innovationen bei der Messdatenauswertung im MFB-Experiment.
- Meinen Zimmerkolleginnen und -kollegen **Julia Zimmermann**, **Elias Puchner**, **Stefan Stahl** und **Julia Sedlmair** für die überaus angenehme Atmosphäre, die gute Zusammenarbeit und hilfreichen Diskussionen.
- **Angelika Kardinal** und **Thomas Nicolaus** für die Hilfe bei Zellkultur und bei der Entwicklung chemischer Verfahren.
- Allen Mitgliedern des **Lehrstuhls für Angewandte Physik** für die engagierte Zusammenarbeit und die hervorragende Atmosphäre.

Curriculum Vitae

Name	Robert Andreas Lugmaier
Geburtsdatum	28.05.1978
Geburtsort	Gräfelfing
Staatsangehörigkeit	deutsch
Sept. 1984 – Jul. 1988	Grundschule Gräfelfing
Sept. 1988 – Jul. 1997	Feodor-Lynen-Gymnasium Planegg
Sept. 1997 – Sept. 1998	Zivildienst im Forschungslabor Prof. Dr. D. Jüngst, Klinikum Großhadern, München
Okt 1998. – Jan. 2005	Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Apr 2005. – Apr. 2008	Promotion am Lehrstuhl für Angewandte Physik, Prof. Dr. H. E. Gaub, Ludwig-Maximilians-Universität München und Center for NanoScience (CeNS) und Exzellenzcluster Nanosystems Initiative Munich (NIM)

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

München, den 24.04.2008

Robert A. Lugmaier